

**Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion der  
Histidinkinase TcsC des pathogenen Schimmelpilzes  
*Aspergillus fumigatus***

von Anna Katharina Vincek

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion der  
Histidinkinase TcsC des pathogenen Schimmelpilzes  
*Aspergillus fumigatus***

von Anna Katharina Vincek  
aus München

München 2020



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. Frank Ebel

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Frank Ebel

**Korreferent/en:** Priv.-Doz. Dr. Maik Dahlhoff  
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel  
Univ.-Prof. Dr. Dušan Palić

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

*Meinen Lieben*

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung.....	1
II.	Literaturübersicht .....	5
1.	<b>Taxonomie von <i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>5</b>
2.	<b>Antifungale Wirkstoffe .....</b>	<b>6</b>
2.1.	Polyene .....	6
2.2.	Echinocandine.....	7
2.3.	Griseofulvin .....	7
2.4.	Nucleosid-Analoga.....	8
2.5.	Azole .....	8
3.	<b><i>Two-component Signaling</i> (TCS)-Systeme am Beispiel des <i>High Osmolarity Glycerol</i> (HOG)-Signalwegs.....</b>	<b>12</b>
3.1.	Histidin-Kinasen in einem prokaryotischen TCS-System.....	12
3.2.	(Hybrid-) Histidin-Kinasen in einem fungalen TCS-System .....	13
3.3.	Der <i>High Osmolarity Glycerol</i> (HOG)-Signalweg .....	18
3.4.	Ablauf des HOG-Signalwegs in <i>A. fumigatus</i> .....	20
3.5.	Künstliche Aktivierung des HOG-Signalwegs .....	24
4.	<b>Lokalisation von TcsC.....</b>	<b>25</b>
5.	<b>TcsC und NikA auf Gensequenzebene .....</b>	<b>28</b>
6.	<b>Studien an dem Protein NimA .....</b>	<b>29</b>
III.	Material und Methoden .....	31
1.	<b>Materialien, Enzyme und Chemikalien.....</b>	<b>31</b>
2.	<b>Organismen, Plasmide und Oligonukleotide.....</b>	<b>31</b>
2.1.	Organismen.....	31
2.2.	Plasmide.....	31
2.3.	Oligonukleotide.....	31
2.4.	Plasmidkonstrukte .....	31
3.	<b>Zellanzucht .....</b>	<b>32</b>
3.1.	Medien .....	32

3.1.1.	Luria Bertani-Medium für <i>Escherichia coli</i> .....	32
3.1.2.	Medien für <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> .....	33
3.1.2.1.	<i>Aspergillus</i> Minimal-Medium (HILL & KAUFER, 2001).....	33
3.1.2.2.	Sabouraud-Dextrose-Medium .....	35
3.1.2.3.	Sorbitol-Agar.....	35
3.2.	Selektionsmarker und Stressoren .....	36
3.3.	Anzucht von <i>E. coli</i> .....	37
3.4.	Anzucht von <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> .....	37
3.4.1.	Anzucht als Flüssigkultur .....	37
3.4.2.	Anzucht in 24-Well-Platten .....	37
3.4.3.	Anzucht in Zellkulturflaschen zur Herstellung einer Sporenstammssuspension .....	37
3.4.4.	Untersuchungen auf Agarplatten.....	38
<b>4.</b>	<b>Molekularbiologische und genetische Methoden .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Amplifizierung von DNS-Fragmenten.....	39
4.2.	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> .....	39
4.3.	Isolierung genomischer DNS aus <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> .....	39
4.4.	Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen .....	40
4.5.	Agarosegelelektrophorese .....	40
4.6.	DNS-Extraktion aus einem Agarosegel .....	41
4.7.	Enzymatische Behandlung von DNS .....	41
4.7.1.	Sequenzspezifische Spaltung von DNS.....	41
4.7.2.	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten ..	41
4.7.3.	Ligation von DNS-Fragmenten.....	41
4.8.	Mutation von Plasmid-DNS .....	42
4.9.	Chemische Transformation von <i>E. coli</i> .....	42
4.9.1.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	42
4.9.2.	Chemische Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	43
4.10.	Deletion einer Hygromycin-Resistenzkassette .....	44
4.11.	Transformation von <i>A. fumigatus</i> und <i>A. nidulans</i> .....	44
4.12.	Sequenzanalysen und Datenbanken .....	46

<b>5.</b>	<b>Mikroskopische Untersuchungen .....</b>	<b>47</b>
5.1.	Mikroskopie fixierter Präparate .....	47
5.1.1.	Fixierung mikroskopischer Präparate.....	47
5.1.2.	Mikroskopische Untersuchung fixierter Präparate.....	48
5.2.	Mikroskopie vitaler Präparate.....	48
IV.	Ergebnisse.....	49
<b>1.</b>	<b>TcsC-/NikA-Studie .....</b>	<b>50</b>
1.1.	Besondere Anforderungen an Plasmide bei Arbeiten mit <i>A. nidulans</i> .....	50
1.2.	Untersuchungen einer <i>ΔtcsC</i> Mutante und deren Komplementationen in hyperosmolarem Milieu.....	52
1.3.	Lokalisation von TcsC und NikA in <i>A. fumigatus</i> bzw. <i>A. nidulans</i> .....	54
1.3.1.	Die Zellkernlokalisierung von TcsC tritt bei N- und C-terminaler Fusion mit GFP auf .....	55
1.3.2.	TcsC ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein.....	56
1.3.3.	Das homologe Protein NikA ist wie TcsC im Zellkern lokalisiert ..	58
1.3.4.	TcsC befindet sich sowohl bei homologer als auch bei heterologer Expression in den Zellkernen eines Pilzes .....	59
1.3.5.	Die Aktivierung von TcsC durch Stressoren führt zu einer Translokation des Proteins in das Zytoplasma .....	60
1.3.6.	Der C-terminale Abschnitt von TcsC ist für die Translokation des Proteins verantwortlich .....	65
1.4.	NLS-Motiv im N-Terminus von TcsC und NikA.....	69
1.4.1.	Untersuchung des N-Terminus von TcsC.....	70
1.4.2.	Untersuchung des N-Terminus von NikA .....	70
1.4.3.	Eingrenzung potentieller Aminosäuren der NLS bei TcsC und NikA 71	
1.4.4.	Manipulation des NLS-Motivs im N-Terminus von TcsC und NikA 78	
1.4.4.1.	Substitution und Deletion von Aminosäuren im N-Terminus eines verkürzten NikA-Teilproteins.....	81

1.4.4.2.	Substitution und Deletion von Aminosäuren im N-Terminus eines verkürzten TcsC-Teilproteins .....	83
1.4.4.3.	Substitution und Deletion von Aminosäuren im N-Terminus eines unverkürzten TcsC-Proteins .....	85
1.5.	Untersuchung der Aktivität eines nativen TcsC-Moleküls bei Überexpression transformierter Proteine.....	100
1.6.	Untersuchung der Zielstruktur von Fludioxonil im TcsC-Molekül .....	107
1.7.	Af-Cbf5 als weiteres Beispiel eines zellkernlokalisierten Proteins .....	111
1.8.	Herstellung des Stammes A26 <i>ΔnikA</i> + <i>gfp</i> für den Einsatz in einem <i>Screening Assay</i> für antifungale Wirkstoffe .....	115
<b>2.</b>	<b>NimA-Studie .....</b>	<b>117</b>
2.1.	Untersuchung der Lokalisation eines heterolog in <i>A. nidulans</i> exprimierten <i>A. fumigatus</i> -NimA-Proteins.....	117
2.2.	Untersuchung der Lokalisation verkürzter NimA-Teilproteine in <i>A. fumigatus</i> .....	120
2.3.	Manipulationen der Aminosäuresequenz von NimA .....	127
V.	Diskussion.....	135
<b>1.</b>	<b>TcsC-/NikA-Studie .....</b>	<b>135</b>
1.1.	TcsC und NikA sind im Zellkern lokalisierte Proteine .....	135
1.2.	TcsC transloziert im aktiven Zustand aus dem Zellkern in das Zytoplasma .....	145
1.3.	Die Überexpression eines GFP-TcsC-Fusionsproteins wirkt sich negativ auf die Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress aus .....	149
1.4.	Untersuchungen einer möglichen Zielstruktur von Fludioxonil in TcsC.....	154
<b>2.</b>	<b>NimA-Studie .....</b>	<b>156</b>
VI.	Zusammenfassung.....	165
VII.	Summary.....	167
VIII.	Literaturverzeichnis.....	169
IX.	Anhang .....	178
X.	Danksagung .....	206

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ABPA	allergisch bronchopulmonale Aspergillose
AmB	Amphotericin B
AMM	<i>Aspergillus</i> Minimal-Medium
bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FastAP	<i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HATPase_c	katalytische Histidin-Kinase-ähnliche ATPase
HBS	<i>Haemorrhagic Bowel Syndrome</i>
HHK	Hybrid-Histidin-Kinase
HisKA	Histidin-Kinase A (Phosphoakzeptor)-Subdomäne
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HK	Histidin-Kinase
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
HPt	<i>Histidine phosphotransfer shuttle</i> -Protein
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LB	Luria Bertani-Medium
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung



---

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNK	Polynukleotid-Kinase
REC	<i>receiver</i> -Domäne
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RR	<i>response regulator</i> -Protein
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
spp.	mehrere Spezies
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TCS	<i>Two-component Signaling</i>
TcsC	<i>Two-component Signaling C</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Infektionszyklus von <i>A. fumigatus</i> in Abhängigkeit von der Art der Immunsuppression eines Patienten.....	3
Abbildung 2: Laktophenolblau-Färbung von <i>Aspergillus fumigatus</i> als typischer Gieskannenschimmel .....	5
Abbildung 3: Taxonomische Klassifikation von <i>A. fumigatus</i> .....	6
Abbildung 4: Relevante Wirkstoffgruppen bei <i>Aspergillus</i> spp.-Infektionen (A) mit den entsprechenden Zielstrukturen in Zellmembran und Zellwand (B) .....	10
Abbildung 5: Autophosphorylierung einer Hybrid-Histidin-Kinase .....	14
Abbildung 6: Vergleichende Darstellung von TCS-Systemen in Prokaryoten und Pilzen .....	15
Abbildung 7: Die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC aus <i>A. fumigatus</i> (TcsC <sub>1-1337</sub> )...	18
Abbildung 8: Ablauf des HOG-Signalwegs in <i>A. fumigatus</i> .....	23
Abbildung 9: Strukturformel des chemischen Stoffes Pyrrolnitrin sowie dessen Derivaten Fenpiclonil und Fludioxonil.....	25
Abbildung 10: Ablauf des HOG-Signalwegs mit schematischer Lokalisation der beteiligten Proteine innerhalb einer Zelle von <i>A. fumigatus</i> .....	27
Abbildung 11: Aminosäuresequenz-Alignment von TcsC <sub>1-237</sub> aus <i>A. fumigatus</i> und NikA <sub>1-199</sub> aus <i>A. nidulans</i> .....	29
Abbildung 12: Das Protein NimA aus <i>A. fumigatus</i> (NimA <sub>1-700</sub> ) .....	30
Abbildung 13: Die Gruppe III-HHK NikA aus <i>A. nidulans</i> (NikA <sub>1-1297</sub> ).....	50
Abbildung 14: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol und 100 µg/ml Doxycyclin .....	53
Abbildung 15: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1 M Natriumchlorid und 100 µg/ml Doxycyclin .....	54
Abbildung 16: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> .....	56
Abbildung 17: AfS35 <i>tcsC-gfp</i> .....	56
Abbildung 18: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> + <i>rfp-stuAC-Terminus</i> .....	57
Abbildung 19: AfS35 <i>AtcsC</i> + <i>gfp-tcsC</i> .....	58
Abbildung 20: A26 <i>gfp-nikA</i> .....	59
Abbildung 21: A26 $\Delta$ <i>nikA</i> + <i>gfp-tcsC</i> .....	60

Abbildung 22: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> + <i>rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub></i> unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil .....	62
Abbildung 23: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> .....	63
Abbildung 24: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol.....	64
Abbildung 25: Die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC aus <i>A. fumigatus</i> (TcsC <sub>1-1337</sub> ) ..	65
Abbildung 26: AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-746</sub></i> .....	66
Abbildung 27: AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-746</sub></i> unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil.....	67
Abbildung 28: AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup></i> unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil.....	68
Abbildung 29: AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-208</sub></i> .....	70
Abbildung 30: A26 <i>nikA<sub>1-170</sub>-gfp</i> .....	71
Abbildung 31: AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-109</sub></i> .....	72
Abbildung 32: AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>109-208</sub></i> .....	73
Abbildung 33: Aminosäuresequenz-Alignment von TcsC <sub>1-234</sub> und NikA <sub>1-196</sub> .....	74
Abbildung 34: AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-162</sub></i> .....	74
Abbildung 35: A26 <i>nikA<sub>1-124</sub>-gfp</i> .....	75
Abbildung 36: AfS35 <i>tcsC<sub>87-162</sub>-gfp</i> .....	76
Abbildung 37: Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der NLS von TcsC in AfS35 .....	77
Abbildung 38: Die Aminosäuresequenz von TcsC nach einer Analyse durch das Online-Tool cNLS Mapper .....	79
Abbildung 39: Die Aminosäuresequenz von TcsC nach einer Analyse durch das Online-Tool NucPred.....	80
Abbildung 40: A26 <i>nikA<sub>1-124</sub><sup>(A92-96)</sup>-gfp</i> .....	81
Abbildung 41: A26 <i>nikA<sub>1-124</sub><sup>(R94E)</sup>-gfp</i> .....	82
Abbildung 42: A26 <i>nikA<sub>1-124</sub><sup>(R94A)</sup>-gfp</i> .....	83
Abbildung 43: AfS35 <i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ127-137)</sup>-gfp</i> .....	84
Abbildung 44: AfS35 <i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(R129D)</sup>-gfp</i> .....	84
Abbildung 45: AfS35 <i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ145-158)</sup>-gfp</i> .....	85
Abbildung 46: AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup></i> .....	86
Abbildung 47: Sequenzanalyse der Aminosäurensubstitution in AfS35 Δ <i>tcsC</i> + <i>gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup></i> .....	87
Abbildung 48: AfS35 Δ <i>tcsC</i> + <i>gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup></i> .....	88
Abbildung 49: AfS35 Δ <i>tcsC</i> + <i>gfp-tcsC<sup>(D155H)</sup></i> .....	89

Abbildung 50: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol.....	91
Abbildung 51: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol.....	91
Abbildung 52: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1 µg/ml Fludioxonil .....	92
Abbildung 53: AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC</i> unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol .....	95
Abbildung 54: AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC</i> <sup>(D155H)</sup> unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol .....	96
Abbildung 55: AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC</i> <sup>(R129D)</sup> unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol .....	97
Abbildung 56: AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC</i> <sup>(D155H)</sup> unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil .....	99
Abbildung 57: Studie von Mischkulturen bezüglich ihrer Anpassungsfähigkeit an hyperosmolare Bedingungen.....	102
Abbildung 58: AfS35 $\Delta tcsC$ unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol.....	103
Abbildung 59: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol.....	105
Abbildung 60: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1 µg/ml Fludioxonil .....	105
Abbildung 61: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> <sub>1-286</sub> .....	106
Abbildung 62: Tüpfeltests auf AMM-Agar mit und ohne hyperosmolarem Stress .....	107
Abbildung 63: Die Gruppe III-HHK Drk1 aus <i>B. dermatitidis</i> (Drk1 <sub>1-1287</sub> ).....	108
Abbildung 64: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> <sup>(C447S)</sup> .....	109
Abbildung 65: AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC</i> <sup>(C447S)</sup> .....	110
Abbildung 66: Agardiffusionstest auf AMM-Agar mit Fludioxonil (7 µg) .....	111
Abbildung 67: Das Protein Af-Cbf5 aus <i>A. fumigatus</i> (Af-Cbf5 <sub>1-487</sub> ) .....	111
Abbildung 68: Sorbitol-Studie einer Mischkultur aus AfS35 <i>gfp-Af-cbf5</i> (grüne Fluoreszenz) und AfS35 (keine Fluoreszenz) .....	113
Abbildung 69: Lokalisation von GFP-Af-Cbf5 in AfS35 vor und nach Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil .....	114
Abbildung 70: <i>Screening Assay</i> zur Identifizierung HOG-aktivierender Substanzen mit AfS35 <i>gfp</i> und AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>rfp</i> .....	116
Abbildung 71: A26 <i>nimA-gfp</i> .....	118
Abbildung 72: AfS35 $\Delta rho4$ + <i>nimA-gfp</i> .....	119
Abbildung 73: AfS35 $\Delta rho4$ + <i>nimA-gfp</i> .....	120
Abbildung 74: Das Protein NimA aus <i>A. fumigatus</i> (NimA <sub>1-700</sub> ) .....	121
Abbildung 75: AfS35 <i>nimA</i> <sub>1-301</sub> - <i>gfp</i> .....	121
Abbildung 76: AfS35 <i>nimA</i> <sub>296-700</sub> - <i>gfp</i> .....	122

Abbildung 77: AfS35 <i>nimA</i> <sub>379-700</sub> -gfp.....	123
Abbildung 78: AfS35 <i>gfp-nimA</i> <sub>292-378</sub> .....	124
Abbildung 79: AfS35 <i>nimA</i> <sub>296-601</sub> -gfp.....	125
Abbildung 80: AfS35 <i>nimA</i> <sub>1-601</sub> -gfp .....	126
Abbildung 81: AfS35 <i>nimA</i> <sub>1-500</sub> -gfp .....	127
Abbildung 82: AfS35 <i>nimA</i> <sup>(D166A)</sup> -gfp .....	129
Abbildung 83: AfS35 <i>nimA</i> <sup>(K40M)</sup> -gfp .....	130
Abbildung 84: AfS35 <i>nimA</i> <sup>(Y91N)</sup> -gfp.....	131
Abbildung 85: AfS35 <i>nimA</i> <sup>(Y91N)</sup> -gfp.....	132
Abbildung 86: Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisation von NimA in AfS35 (1) .....	133
Abbildung 87: Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisation von NimA in AfS35 (2) .....	134

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS ANHANG

Abbildung A 1: Aminosäuresequenz-Alignment der zu TcsC aus <i>A. fumigatus</i> homologen Proteine aus <i>A. terreus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. nidulans</i> und <i>A. niger</i> .....	193
Abbildung A 2: pSK379 .....	194
Abbildung A 3: pSK379-gfp.....	195
Abbildung A 4: pSilent.....	196
Abbildung A 5: pSK379-hygromycin (pAV24).....	197
Abbildung A 6: pCR2.1 <i>tcsC</i> upstream-hygromycin- <i>tcsC</i> downstream .....	198
Abbildung A 7: pSS015.....	199
Abbildung A 8: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 100 µg/ml Doxycyclin.....	200
Abbildung A 9: AfS35 <i>gfp-tcsC</i> + <i>rfp-stuAC</i> -Terminus .....	200
Abbildung A 10: A26 <i>nikA</i> -gfp .....	201
Abbildung A 11: A26 $\Delta$ <i>nikA</i> + <i>nikA</i> <sub>1-170</sub> -gfp .....	201
Abbildung A 12: A26 <i>gfp-tcsC</i> <sub>1-109</sub> .....	202
Abbildung A 13: A26 <i>gfp-tcsC</i> <sub>109-208</sub> .....	202
Abbildung A 14: Tüpfeltest auf AMM-Agar.....	203
Abbildung A 15: Tüpfeltest auf AMM-Agar.....	203

---

Abbildung A 16: Aminosäuresequenz-Alignment der Hybrid-Histidin-Kinasen Drk1 aus <i>B. dermatitidis</i> und TcsC aus <i>A. fumigatus</i> .....	205
Abbildung A 17: Aminosäuresequenz-Alignment der homologen NimA-Proteine aus <i>A. nidulans</i> und <i>A. fumigatus</i> .....	205

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Inhaltsstoffe des LB-Flüssigmediums.....	32
Tabelle 2: Inhaltsstoffe des LB-Agars.....	32
Tabelle 3: Inhaltsstoffe des AMM-Flüssigmediums.....	33
Tabelle 4: Inhaltsstoffe des 2x AMM-Flüssigmediums ohne Glucose .....	33
Tabelle 5: Inhaltsstoffe des AMM-Agars .....	34
Tabelle 6: Inhaltsstoffe der 20x Salzlösung (ohne MgSO <sub>4</sub> und ohne Stickstoffquelle) .....	34
Tabelle 7: Inhaltsstoff der MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O-Lösung (0,4 M) .....	34
Tabelle 8: Inhaltsstoffe der Spurenelementlösung (nach Hunter) (HILL & KAFER, 2001).....	34
Tabelle 9: Inhaltsstoffe des AMM-Xylose-Agars.....	35
Tabelle 10: Inhaltsstoffe des Sabouraud-Dextrose-Flüssigmediums .....	35
Tabelle 11: Inhaltsstoffe des Sabouraud-Dextrose-Agars .....	35
Tabelle 12: Inhaltsstoffe des Sorbitol-Agars (1,2 M).....	36
Tabelle 13: Inhaltsstoffe des Sorbitol-Softagars (1,2 M) .....	36
Tabelle 14: Konzentrationen der eingesetzten Selektionsmarker .....	36
Tabelle 15: Konzentrationen der eingesetzten Stressoren .....	36
Tabelle 16: Inhaltsstoffe des Transformationspuffers I.....	42
Tabelle 17: Inhaltsstoffe des Transformationspuffers II .....	43
Tabelle 18: Inhaltsstoffe der Lösung I.....	44
Tabelle 19: Inhaltsstoffe der Lösung II .....	45
Tabelle 20: Inhaltsstoffe der Lösung III.....	45
Tabelle 21: Inhaltsstoffe der Lösung IV.....	45

**TABELLENVERZEICHNIS ANHANG**

Tabelle A 1: Verwendete Pilzstämme in TcsC/NikA-Studie .....	181
Tabelle A 2: Verwendete Pilzstämme in NimA-Studie .....	182
Tabelle A 3: Verwendete Plasmide.....	182
Tabelle A 4: Verwendete Oligonukleotide für TcsC/NikA-Studie.....	186
Tabelle A 5: Verwendete Oligonukleotide in NimA-Studie .....	187
Tabelle A 6: Verwendete Plasmidkonstrukte in TcsC/NikA-Studie.....	189
Tabelle A 7: Verwendete Plasmidkonstrukte in NimA-Studie.....	190

## I. EINLEITUNG

Schimmelpilze sind Saprophyten, die ubiquitär vorkommen und sich hauptsächlich von verrottendem pflanzlichem Material ernähren. Sie können sich an eine Vielzahl organischer Substrate und äußerer Umwelteinflüsse anpassen und sind dank ihrer robusten Art weit verbreitet. Sie weisen zwar als primär saprophytische Organismen keine ausgeprägten Virulenzfaktoren auf, können aber durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit als Opportunisten auch bei Menschen und Tieren Fuß fassen und dort teils schwere Erkrankungen hervorrufen.

Pathogene Schimmelpilze sind vor allem bei Insekten, Pflanzen und Amphibien bedeutende Krankheitserreger und wachsen bevorzugt bei Raumtemperatur (MCCORMICK *et al.*, 2010). Aufgrund dieses Temperaturoptimums besteht die Hypothese, dass sich die erhöhte physiologische Körpertemperatur der Wirbeltiere als ein Abwehrmechanismus gegenüber pathogenen Pilzen entwickelt haben könnte (CASADEVALL, 2005). Es gibt jedoch einige Krankheitserreger wie die Pilzspezies *Aspergillus fumigatus*, neben *Candida* spp. einer der bedeutendsten Vertreter pathogener Pilze beim Menschen (SHOR & CHAUHAN, 2015), die eine hohe Temperaturtoleranz besitzen, wodurch sie auch in Wirbeltieren zu Erkrankungen führen. Das Wachstumsoptimum von *A. fumigatus* liegt beispielsweise zwischen 37 - 42 °C, wobei noch bei bis zu 55 °C Wachstum möglich ist. Es wird vermutet, dass unter anderem diese Thermotoleranz eine Basis seiner Virulenz bildet (MCCORMICK *et al.*, 2010; SUGUI *et al.*, 2014).

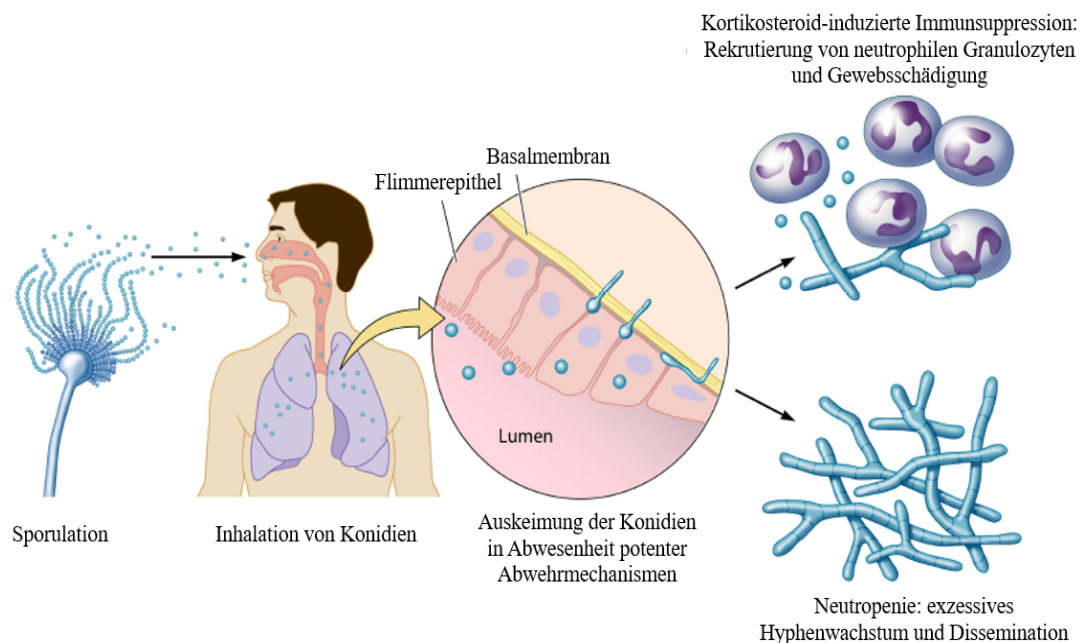
Ein weiterer Grund für die Prävalenz von *A. fumigatus* als Haupterreger der Aspergillose ist sein ubiquitäres Auftreten mit massiver Sporenbildung, wodurch ein Mensch täglich durchschnittlich Hunderte asexuelle Sporen, sogenannte Konidien, einatmet (LATGE, 1999). Im Lebenszyklus des Pilzes werden Konidien bei Luftkontakt von Konidienträgern (auch Konidiophoren genannt) gebildet und nach ihrer Freisetzung aerogen verbreitet. Konidien bleiben inaktiv, bis sie auf günstige Umweltbedingungen stoßen, die eine Aktivierung ihres Stoffwechsels ermöglichen. Ist dies der Fall, so schwellen sie an und keimen zu Hyphen aus, welche ihrerseits zu einem Pilzgeflecht (Myzel) anwachsen und erneut Konidien bilden (SUGUI *et al.*, 2014). De facto ist *A. fumigatus* als saprophytischer Schimmelpilz auf ein Leben im Erdboden spezialisiert. Die Infektion von



Menschen und Tieren ist eher als Ausnahme anzusehen und verläuft bei immunkompetenten Wirten für den Pilz meist tödlich (LATGE, 1999). Ist das Immunsystem des Wirts jedoch geschwächt, können sich gefährliche Aspergillosen entwickeln. Dies betrifft bei Menschen hauptsächlich immunsupprimierte Patienten mit akuter Leukämie und anderen malignen hämatologischen Erkrankungen (HAMMOND *et al.*, 2010; NEOFYTOS *et al.*, 2013; RYBAK *et al.*, 2019) sowie Patienten nach Organ- und Stammzelltransplantation (RUHNKE *et al.*, 2015; RYBAK *et al.*, 2019). Seltener treten Aspergillosen bei HIV-Infektionen (LATGE, 1999; HAKKOUNI & MANSOURI, 2018) oder langfristiger Kortikosteroidtherapie auf (THOMPSON & PATTERSON, 2008; RUHNKE *et al.*, 2015). Auch Vorerkrankungen wie Tuberkulose, zystische Fibrose oder Bronchiektasie können eine Pilzinfektion begünstigen (AMITANI *et al.*, 1995). Die Erkrankung verläuft oft schwer und ist potentiell lebensbedrohlich. Die Mortalitätsrate variiert bei Patienten mit akuter Leukämie, die als Komorbidität eine invasive Mykose entwickeln, zwischen 60 % (NEOFYTOS *et al.*, 2013) und 90 % (LATGE, 1999).

Eine Infektion wird meist über die Inhalation von Konidien eingeleitet, welche dank ihres Durchmessers von nur 2-3  $\mu\text{m}$  bis in die Lungenalveolen vordringen können (LATGE, 1999). Dort werden sie im Normalfall von einem kompetenten Immunsystem erfolgreich bekämpft. Die Abwehr beruht neben den anatomischen Barrieren des Flimmerepithels des Atmungstraktes und der Surfactant-Sekretion in den Alveolen auf einer unspezifischen Immunreaktion. Dabei vermitteln vordergründig Alveolarmakrophagen die zelluläre Immunantwort, sie phagozytieren und lysieren den Großteil inhalierter Sporen. Überstehen manche Konidien die Phagozytose oder entgehen den Makrophagen gänzlich, so wandern neutrophile Granulozyten in das Gewebe ein und bekämpfen die restlichen Erreger, auch wenn bereits erste Pilzhyphen gebildet werden konnten (LATGE, 1999). Weshalb die fortlaufende Sporenbelastung nicht zu einem chronischen Entzündungsgeschehen im Wirtsorganismus führt, war für die Wissenschaft lange Zeit ein Rätsel. Vor kurzem wurde jedoch entdeckt, dass jede Konidie von einer Schicht aus hydrophoben Proteinen, der sogenannten *rodlet layer*, umhüllt ist. Speziell das Protein RodA ist dabei für die Maskierung des Erregers verantwortlich und verhindert eine übermäßig starke Immunreaktion, was in diesem Fall auch für den Wirt von Vorteil ist. Hierdurch werden überschießende Entzündungsgeschehen

und damit auch Schäden im Gewebe vermieden (AIMANIANDA *et al.*, 2009). Ist das Immunsystem des Wirtes jedoch geschwächt, können die Abwehrzellen nicht ausreichend effektiv gegen die Sporen vorgehen, wodurch diese auskeimen und zu schweren invasiven oder disseminierten Infektionen führen können (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Das Risiko einer Pilzinfektion ist dabei klar mit einer Neutropenie assoziiert, wie sie bei Patienten mit akuter Leukämie oder bei Chemotherapie-Patienten auftritt, und steigt deutlich, je länger die Neutropenie anhält (LATGE, 1999; HAMMOND *et al.*, 2010). Dies zeigt, dass Alveolarmakrophagen alleine keinen ausreichenden Schutz vor einer Pilzinfektion bieten, sondern zusätzlich neutrophile Granulozyten zur Infektionsbekämpfung vonnöten sind. Abbildung 1 zeigt den Infektionszyklus von *A. fumigatus* nach Inhalation durch einen immunsupprimierten Patienten.



**Abbildung 1: Infektionszyklus von *A. fumigatus* in Abhängigkeit von der Art der Immunsuppression eines Patienten**

modifiziert nach (DAGENAIS & KELLER, 2009)

*A. fumigatus* kann verschiedene Erkrankungen auslösen, die in Ausprägung und Schweregrad vom immunologischen Status des Wirtes abhängen. Beim Menschen häufiger auftretende Krankheitsformen sind dabei die invasive pulmonale Aspergillose, das Aspergillom sowie verschiedene Formen von Überempfindlichkeitsreaktionen wie allergisches Asthma, Hypersensibilitätspneumonitis und allergisch bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) (LATGE, 1999; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Neben *A. fumigatus*

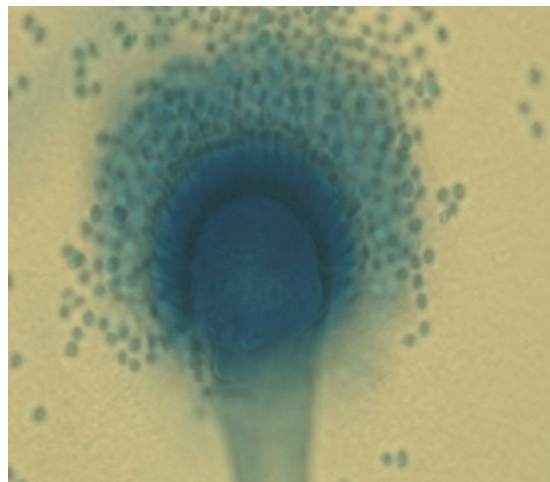
kommen auch andere *Aspergillus*-Spezies als bedeutende Krankheitserreger vor. *A. flavus* ist beispielsweise nach *A. fumigatus* die zweithäufigste Ursache invasiver pulmonaler Aspergillosen und die häufigste Ursache oberflächlicher Infektionen von Wunden, kutaner Aspergillose und *Aspergillus*-Keratitis. Zudem ist *A. flavus* durch die Produktion des hoch toxischen und hepatokanzerogenen Mykotoxins Aflatoxin (eine Abkürzung für *Aspergillus flavus*-Toxin) besonders bei Landwirten als Erntekontaminant gefürchtet (HEDAYATI *et al.*, 2007). Seltener führen Infektionen mit *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* zu invasiven pulmonalen Aspergillosen, wobei speziell *A. terreus* aufgrund seiner natürlichen Resistenz gegenüber dem antimykotischen Wirkstoff Amphotericin B schwierig zu therapieren ist (IWEN *et al.*, 1998; SUTTON *et al.*, 1999).

Auch in der Veterinärmedizin kommen Aspergillosen vor. Die primäre Infektion findet hier meist ebenfalls in der Lunge statt. Es kann sich daraufhin eine von der Lunge ausgehende, generalisierte Infektion entwickeln, die je nach Tierart unterschiedliche Prädispositionsorgane aufweist (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Bei Vögeln tritt die pulmonale Aspergillose mit einhergehender Luftsackentzündung (*Aerosacculitis*) vor allem nach hoher Sporenbelastung auf (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Sie führt bei Wirtschaftsgeflügel wie Puten durch vermindertes Wachstum sowie Mortalitätsraten von bis zu 90 % zu schweren Verlusten. Luftsackaspergillosen kommen auch bei Wildvögeln wie Möwen sowie in Gefangenschaft gehaltenen Papageien und Pinguinen vor (ARNE *et al.*, 2011). Bei Rindern ist *A. fumigatus* im Zusammenhang mit Euterinfektionen, Aborten und Pneumonien bekannt, wobei der Erreger meist über verschimmeltes Futter aufgenommen wird (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015). Er steht außerdem als Auslöser des *Haemorrhagic Bowel Syndrome* (HBS) in der Diskussion (PUNTENNEY *et al.*, 2003). Aspergillosen treten auch bei Pferden als Luftsackmykosen (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015) und bei Hunden vor allem als sinonasale Infektionen auf (SCHULTZ *et al.*, 2008). Eine Infektion mit *A. fumigatus* ist hier nach unspezifischer Rhinitis und Neoplasie die dritthäufigste Ätiologie chronischen Nasenausflusses (MELER *et al.*, 2008). Auch bei Invertebraten wie der Honigbiene kommen Mykosen vor, hier führen Infektionen mit *Aspergillus*-Spezies, darunter hauptsächlich *A. flavus* und *A. fumigatus*, zur sogenannten Steinbrut (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Taxonomie von *Aspergillus fumigatus*

Die Gattung *Aspergillus* wurde 1729 von dem italienischen Botaniker Pier Antonio Micheli beschrieben, der die Wuchsform der Konidienträger mit einem Weihwasserwedel (Aspergill) verglich. Heute spricht man bei *Aspergillus* aufgrund dieser Wuchsform auch von einem Gieskannenschimmel. Abbildung 2 zeigt die typische Wuchsform eines Konidienträgers der Spezies *A. fumigatus*.



**Abbildung 2: Laktophenolblau-Färbung von *Aspergillus fumigatus* als typischer Gieskannenschimmel**

Immersions-Lichtmikroskopie mit 100x Vergrößerung

Die erste Dokumentation einer pulmonalen Aspergillose beim Menschen erfolgte 1847 durch den Medizinstudenten Theodor Slyter (SEEBACHER *et al.*, 2017). Umfassend beschrieben wurde die Spezies *Aspergillus fumigatus* allerdings erst im Jahre 1863 durch den deutschen Arzt und Botaniker Georg Fresenius, der den Pilz aus der Lunge einer Großtrappe (*Otis tarda*) isolierte (SCHMIDT, 1998). Die Bezeichnung des Erregers ist auf das lateinische Wort *fumus* für Rauch zurückzuführen, da die Sporen des Pilzes eine gräuliche Farbe aufweisen und durch die Luft verbreitet einer Rauchwolke ähneln. *A. fumigatus* kann sich sowohl vegetativ als auch sexuell vermehren, womit er der Klasse der *Ascomycota* zugeordnet wird (O'GORMAN *et al.*, 2009). Abbildung 3 beinhaltet seine taxonomische Klassifikation.

---

Domäne: *Eucaryota*  
Reich: *Fungi* (Pilze)  
Abteilung: *Ascomycota* (Schlauchpilze)  
Klasse: *Ascomycetes* (Echte Schlauchpilze)  
Ordnung: *Eurotiales*  
Familie: *Trichocomaceae*  
Gattung: *Aspergillus* (Gießkannenschimmel)  
Hauptarten: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*

---

### **Abbildung 3: Taxonomische Klassifikation von *A. fumigatus***

(DE HOOG *et al.*, 2000)

Die Gattung *Aspergillus* weist einige medizinisch relevante, fakultativ pathogene Spezies auf, welche zu Infektionen führen, die auch unter Therapie hohe Mortalitätsraten aufweisen können. Einzelne *Aspergillus*-Spezies, darunter *A. flavus*, sind in der Lage, Mykotoxine wie die kanzerogen wirkenden Aflatoxine zu produzieren (LAN *et al.*, 2019). Andere Vertreter, wie *A. niger*, finden jedoch auch Anwendung in der Industrie und Lebensmittelherstellung, wo die von ihnen produzierten Enzyme wie die Amano Lipase A als Biokatalysatoren eingesetzt werden (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

## **2. Antifungale Wirkstoffe**

### **2.1. Polyene**

Für den präventiven sowie therapeutischen Einsatz existiert insgesamt nur eine begrenzte Anzahl an antifungalen Wirkstoffen. Als historisch wichtigstes Antimykotikum war Amphotericin B (AmB) aus der Gruppe der Polyene lange Zeit die erste Wahl bei der Behandlung von Aspergillosen (LATGE, 1999). Polyene binden an Ergosterol, einen Bestandteil der fungalen Zellwand. Dies führt zur Bildung transmembraner Poren, welche eine starke Schädigung der Zelle bis hin zum Zelltod hervorrufen (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Das Wirkspektrum von Amphotericin B ist sehr breit. Die meisten pathogenen Pilze inklusive *Aspergillus* spp. sind darauf sensibel, nur *A. terreus* weist eine natürliche Resistenz auf (SUTTON *et al.*, 1999).

Amphotericin B hat eine hohe Zahl an Nebenwirkungen, unter anderem starke Nephrotoxizität, weshalb sein Einsatz mittlerweile beschränkt ist. Mit der Entwicklung von Lipidformulierungen (liposomales AmB) wurde die

nephrotoxische Wirkung zwar vermindert, diese Wirkstoffe müssen jedoch in höherer Dosierung verabreicht werden und können ihrerseits zu Nebenwirkungen wie Atemnot und Hypoxie führen (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Aufgrund seiner geringen Verträglichkeit wird Amphotericin B deshalb mittlerweile nur als Alternativmedikation eingesetzt, wenn die üblichen Stoffgruppen kontraindiziert oder nicht wirksam sind (PATTERSON *et al.*, 2016). In der Veterinärmedizin hat der Wirkstoff keine Zulassung. Er wird allerdings häufig umgewidmet und führt bei Aspergillosen des Hundes in Kombination mit dem Triazol Itraconazol, seltener auch Voriconazol, zu teils guten Therapieergebnissen (SCHULTZ *et al.*, 2008). Die durch Amphotericin B verursachte starke Nierenschädigung bedingt jedoch häufig ein frühes Absetzen (SCHULTZ *et al.*, 2008). Ein weiterer Vertreter der Polyene ist der Wirkstoff Nystatin, welcher hauptsächlich oral oder topisch bei *Candida* spp.- und *Malassezia* spp.-Infektionen angewendet wird. Er ist bei den meisten *Aspergillus* spp. unwirksam (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018).

## 2.2. Echinocandine

Echinocandine hemmen die Synthese von  $\beta$ -1,3-D-Glucan, einem wichtigen Baustein der fungalen Zellwand. Zu dieser Gruppe zählen die Wirkstoffe Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin, wobei in der Humanmedizin derzeit hauptsächlich Caspofungin Anwendung findet. Es sind bei dieser Wirkstoffgruppe nur wenige Nebenwirkungen bekannt, zu diesen zählen anaphylaktische und anaphylaktoide Reaktionen, welche hauptsächlich nach schneller intravenöser Applikation auftreten (BENNETT, 2006). Caspofungin wirkt bei *Candida* spp. fungizid (BACHMANN *et al.*, 2002), bei *Aspergillus* spp. fungistatisch (BOWMAN *et al.*, 2006). Die Anwendung bei Aspergillosen wird derzeit nur dann empfohlen, wenn vorherige Behandlungen mit anderen Präparaten fehlschlagen oder Kontraindikationen zu Azolen und Polyenen bestehen (PATTERSON *et al.*, 2016). Caspofungin ist in der Tiermedizin nicht zugelassen (SCHULTZ *et al.*, 2008).

## 2.3. Griseofulvin

Griseofulvin ist der einzige Wirkstoff, der in der Tiermedizin zur systemischen Anwendung bei Mykosen zugelassen ist (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Er akkumuliert durch die Bindung an Keratin in Haaren, Nägeln bzw. Krallen sowie

der Haut und findet deshalb sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin Einsatz bei der Therapie von Dermatophytosen (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Bei der Behandlung von Aspergillosen spielt dieses antifungale Mittel keine Rolle.

#### 2.4. Nucleosid-Analoga

Nucleosid-Analoga wie Flucytosin sind Derivate natürlicher Nucleoside und werden nach enzymatischer Umwandlung durch die fungalen Enzyme Cytosin-Desaminase und Uracil-Phosphoribosyltransferase in die RNS und DNS des Pathogens eingebaut, wo sie zu einer fehlerhaften Protein- und DNS-Synthese führen (GSALLER *et al.*, 2018). Dieser Wirkstoffgruppe gehören viele Virostatika an, einzelne Wirkstoffe finden jedoch auch Anwendung bei Infektionen mit pathogenen Pilzen wie *Cryptococcus* spp. (PFALLER *et al.*, 2005). Bei *Aspergillus* spp. zeigen Nucleosid-Analoga nur geringe Wirksamkeit (VERWEIJ *et al.*, 2008), weshalb ihr Einsatz bei Aspergillosen derzeit nicht empfohlen wird (PATTERSON *et al.*, 2016).

#### 2.5. Azole

Azole sind die in Human- und Veterinärmedizin am häufigsten verwendeten Wirkstoffe gegen Mykosen. Sie inhibieren Cytochrom P450-Isoenzyme wie die fungale Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase, welche an der Ergosterolsynthese in der Zellmembran des Pilzes beteiligt ist. Diese Inhibition führt zu einer Zellwandschädigung und damit zu einem verringerten Hyphenwachstum bis hin zum Zelltod (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Azole interagieren allerdings auch mit humanem Cytochrom P450, welches vor allem in Leberzellen zu finden ist. Daher ist als Nebenwirkung eine gewisse Hepatotoxizität zu beobachten, die verstärkt auftritt, wenn der Patient zeitgleich weitere, ebenfalls über Cytochrom P450 verstoffwechselte Medikamente einnimmt (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Azole werden in die zwei Gruppen der Imidazole und Triazole aufgeteilt. Ketokonazol, der wichtigste Vertreter der Imidazole, wurde Anfang 1980 entwickelt und war das erste orale Breitspektrum-Antimykotikum (MAERTENS, 2004; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Viele Nebenwirkungen sowie die mangelhafte Bioverfügbarkeit und Potenz von Ketokonazol führten jedoch dazu, dass wenig später eine weitere Azolderivat-Gruppe entwickelt wurde: die Triazole (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). Sie sind heute die am häufigsten eingesetzten antifungalen Wirkstoffe (SHOR & CHAUHAN, 2015; PATTERSON

*et al.*, 2016). Als Triazol der ersten Generation findet Itraconazol sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin Einsatz bei der Therapie von Aspergillosen, wo es mittlerweile den Wirkstoff Amphotericin B ersetzt. Es hat allerdings seinerseits Schwachstellen wie fehlende Applikationsformen für intravenöse Injektionen (LATGE, 1999). In der Humanmedizin gilt derzeit das Triazol Voriconazol als Therapeutikum erster Wahl bei Infektionen mit *Aspergillus* spp. (PATTERSON *et al.*, 2016; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018), sein Einsatz in der Veterinärmedizin ist jedoch aufgrund hoher Therapiekosten eher selten. Weitere zur Behandlung von Aspergillosen geeignete Triazole sind Posaconazol (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018) und Isavuconazol (LEDOUX *et al.*, 2018; RYBAK *et al.*, 2019). Letzteres wurde bisher noch in keiner veterinärmedizinischen Studie untersucht. Das Triazol Fluconazol ist bei *Aspergillus* spp. unwirksam und daher nicht für die Prävention oder Therapie von Aspergillosen geeignet (MELLADO *et al.*, 2007; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018).

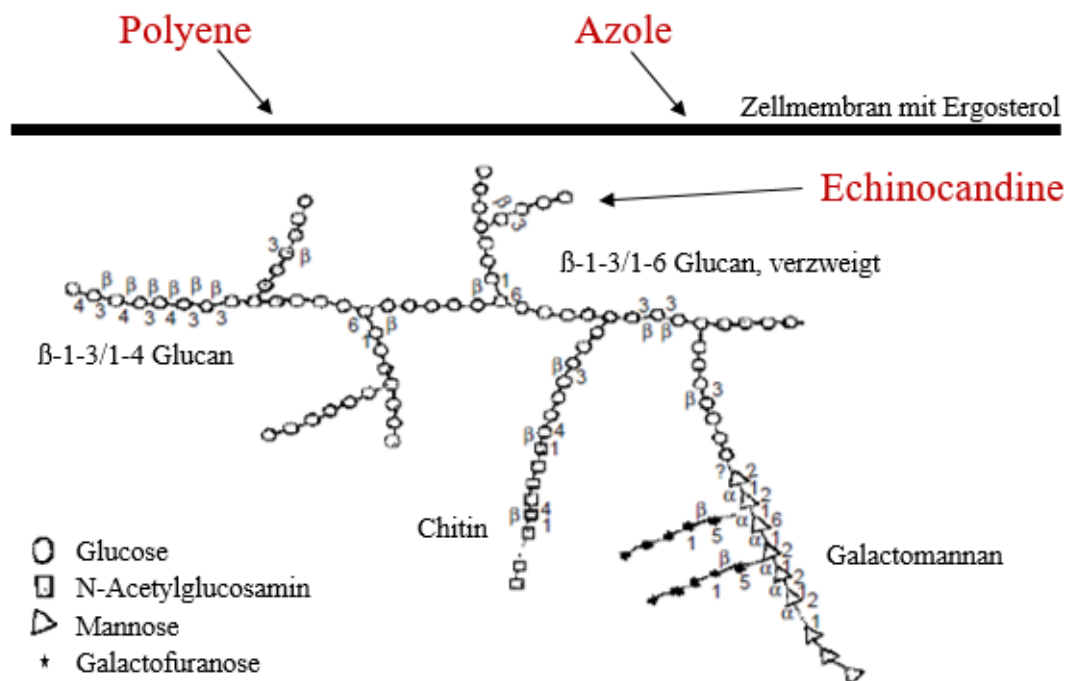
Azole sind nicht nur im medizinischen Kontext relevant. Sie finden bereits seit Mitte der 1960er Jahre Anwendung in der Landwirtschaft und werden hauptsächlich beim Getreide- und Weinanbau als Fungizide eingesetzt. In Europa werden jährlich bis zu 50 % aller Getreide- und Weinanbauflächen mit Azolen behandelt (AZEVEDO *et al.*, 2015). Azol-Moleküle sind sehr stabil, sie können für lange Zeit in Erdboden und Wasser überdauern. Da der Erdboden den natürlichen Lebensraum fakultativ pathogener *Aspergillus* spp. darstellt, kann die lange Halbwertszeit der Azole eine Resistenzbildung bei diesen Schimmelpilzen begünstigen (AZEVEDO *et al.*, 2015). Ebenjene Resistenzbildung führt mittlerweile zu schwerwiegenden Therapieengpässen bei der Behandlung von *Aspergillus*-Infektionen, wobei die in der Medizin häufig empirisch eingesetzten Triazole besonders stark betroffen sind (MELLADO *et al.*, 2007; VERWEIJ *et al.*, 2016; RYBAK *et al.*, 2019). Es ist demnach dringend notwendig, neue Medikamente zu entwickeln, um die eher selten auftretende, jedoch bei Manifestation potenziell lebensgefährlich verlaufende Aspergillose behandeln zu können. In Abbildung 4 sind die bei einer *Aspergillus*-Infektion relevanten Wirkstoffgruppen sowie deren Zielstrukturen in fungalen Zellen dargestellt.



A)

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Wirkmechanismus
Polyene	Amphotericin B Liposomales AmB	Porenbildung in der Zellmembran nach Bindung an Ergosterol
Echinocandine	Caspofungin Micafungin Anidulafungin	Schwächung der Zellwand durch Inhibition der $\beta$ -1,3-D-Glucan-Synthase
Azole	Voriconazol Posaconazol Isavuconazol Ketokonazol Itraconazol	Schädigung der Zellmembran durch Inhibition von Cytochrom P450-Isoenzymen

B)



**Abbildung 4: Relevante Wirkstoffgruppen bei *Aspergillus* spp.-Infektionen (A) mit den entsprechenden Zielstrukturen in Zellmembran und Zellwand (B)**

B) modifiziert nach (BEAUVAIS & LATGE, 2001)

In Anbetracht der beschränkten Auswahl antimykotischer Wirkstoffe, die im Falle einer Aspergillose wirksam sind, herrscht ein deutlicher Handlungsbedarf bei der Suche nach neuen Therapieoptionen. Einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika bieten sogenannte *Two-component Signaling* (TCS)-Systeme, die unter Einbindung von Histidin-Kinasen Einflüsse aus der Umgebung wahrnehmen und den Organismus auf Milieuveränderungen einstellen. Sie kommen in Prokaryoten, Pflanzen und auch Eukaryoten wie *A. fumigatus* vor, wo sie vermutlich zur Virulenz des Schimmelpilzes beitragen (SHOR & CHAUHAN, 2015). Interessant ist, dass Substanzen, die auf fungale TCS-Systeme einwirken, eine Schädigung des Pilzes nicht durch eine Inhibition, sondern eine übermäßige Aktivierung der TCS-Enzymkaskade hervorrufen. Diese Wirkung unterscheidet sie von bislang üblichen antifungalen Therapeutika, die auf eine Inhibition wichtiger Stoffwechselvorgänge des Pathogens zielen. Zudem sind solche TCS-Systeme nicht in Säugetierzellen vorhanden (CATLETT *et al.*, 2003; BAHN, 2008). Substanzen, die Einfluss auf fungale TCS-Systeme ausüben, wirken somit negativ auf Virulenzfaktoren und vitalitätssichernde Prozesse des Pilzes ein, ohne dass bei ihrem Einsatz mit starken Nebenwirkungen im Wirtsorganismus gerechnet werden muss. Sie stellen damit eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antimykotika in der Human- und Veterinärmedizin dar (CATLETT *et al.*, 2003; BAHN, 2008; DEFOSSE *et al.*, 2015; SHOR & CHAUHAN, 2015).

### 3. ***Two-component Signaling (TCS)-Systeme am Beispiel des High Osmolarity Glycerol (HOG)-Signalwegs***

Als eine potenzielle Zielstruktur neuer antimykotischer Wirkstoffe sollen TCS-Systeme bei Prokaryoten und Eukaryoten im Folgenden genauer vorgestellt werden. Schimmelpilze müssen sich wie alle ein- oder mehrzelligen Organismen auf äußere Einwirkungen anpassen können, um überlebensfähig zu sein. Dabei ist das Umgebungsmilieu speziell für pathogene Mikroorganismen während einer Infektion als unwirtlich und die äußeren Einflüsse demnach als Stress für den Organismus anzusehen (BAHN, 2008). Für eine erfolgreiche Virulenz müssen sie einer Vielzahl wirtsspezifischer Faktoren wie Immunzellen bei Tieren und Menschen sowie Fettsäuren und harten mechanischen Oberflächen bei Pflanzen entgegenwirken (BAHN *et al.*, 2007). Die Anpassungsreaktionen werden dabei über spezielle Signalwege koordiniert, die meist mehrere Komponenten wie Sensoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren enthalten. Bei Prokaryoten sind TCS-Systeme weit verbreitet und wurden dort auch zuerst entdeckt. Ein wesentliches Element aller TCS-Systeme stellen Histidin-Kinasen dar. Diese Enzyme sind in Bakterien, Archaeen, Pflanzen und auch Pilzen zu finden. Ihre Funktion ist das Erkennen und Verarbeiten intra- und extrazellulärer Signale, womit sie unter anderem für Zelldifferenzierung, Wachstum sowie Virulenz pathogener Organismen verantwortlich sind (CATLETT *et al.*, 2003; BAHN, 2008). Mittlerweile ist auch in Eukaryoten eine Vielzahl an TCS-Systemen identifiziert und analysiert worden (POSAS *et al.*, 1996). Funktion und Ablauf von TCS-Systemen bei Prokaryoten und Eukaryoten sollen in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden.

#### 3.1. **Histidin-Kinasen in einem prokaryotischen TCS-System**

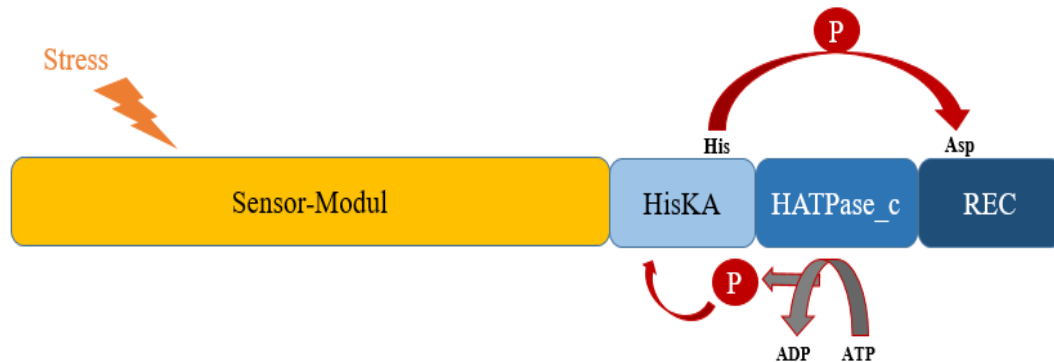
In einem prokaryotischen TCS-System nimmt eine transmembranöse Histidin-Kinase (HK) als erste Komponente des Signalwegs einen Stimulus aus der Umwelt mittels ihrer extrazellulären Sensor-Domäne auf und reagiert darauf mit einer Aktivierung oder Inhibierung der Kinaseaktivität ihrer intrazellulären Histidin-Kinase-Domäne. Die zweite Komponente des TCS-Systems besteht typischerweise aus einem zytoplasmatischen *response regulator* (RR)-Protein mit einer gut konservierten *receiver*-Domäne sowie einer variablen DNS-Bindungsdomäne. Bei Aktivierung der Sensor-HK wird ein Histidin-Rest der

Histidin-Kinase-Domäne autophosphoryliert, woraufhin das Protein als Kinase aktiv wird und die Phosphorylierung eines Aspartatrest in der *receiver*-Domäne des korrespondierenden RR katalysiert. Dieses wird nun seinerseits als Transkriptionsfaktor aktiv und nimmt so Einfluss auf die Expression von Genen, welche den Organismus über eine Stressantwort auf das veränderte Milieu einstellen können (POSAS *et al.*, 1996; CATLETT *et al.*, 2003; LAVIN *et al.*, 2010). Der Ablauf eines prokaryotischen TCS-Systems im Vergleich zu einem fungalen TCS-System ist in Abbildung 6 dargestellt.

### 3.2. (Hybrid-) Histidin-Kinasen in einem fungalen TCS-System

Fungale Histidin-Kinasen werden als Hybrid-Histidin-Kinasen (HHKs) definiert, da sie neben der bei prokaryotischen Histidin-Kinasen üblichen Sensor- und Kinase-Domäne zusätzlich eine *receiver*-Domäne beinhalten. Dies ist bei den meisten prokaryotischen Histidin-Kinasen nicht der Fall (DEFOSSE *et al.*, 2015). Somit ergeben fungale HHKs in sich bereits ein TCS-System, bei welchem die zwei Komponenten (HK und RR) zu einem Protein fusioniert sind. HHKs sind jedoch isoliert nicht funktionell, sondern benötigen für ihre Aktivität ein weiteres Protein mit *receiver*-Domäne, welches im Laufe der Signalverarbeitung phosphoryliert werden kann (POSAS *et al.*, 1996). Sie können sowohl das Vorhandensein als auch das Ausbleiben von Stresssignalen wahrnehmen und darauf mit einer Aktivierung oder Inaktivierung reagieren (SHOR & CHAUHAN, 2015). HHKs enthalten im Allgemeinen die folgenden drei Hauptkomponenten: ein Sensor-Modul am N-Terminus des Proteins, welches sehr variabel in Sequenz und Länge sein kann und für die Wahrnehmung diverser Stimuli verantwortlich ist; eine zentrale Region mit Transmitterfunktion, welche eine Histidin-Kinase A (HisKA)-Subdomäne und eine katalytisch wirkende Histidin-Kinase-ähnliche ATPase (HATPase\_c)-Subdomäne beinhaltet; sowie eine gut konservierte C-terminale *receiver*-Domäne (REC). Die HisKA-Subdomäne enthält stets einen konservierten Histidin-Rest in der sogenannten H-Box, welcher im Zuge der Signalverarbeitung durch die HATPase\_c-Subdomäne phosphoryliert wird. Die C-terminale *receiver*-Domäne weist das gut konservierte Aminosäuren-Triplet DDK aus Aspartat- und Lysinresten auf, wobei ein Aspartat-Rest für die Phosphatgruppe zur Verfügung steht, welche während der Transautophosphorylierung des Proteins von der Histidin-Kinase-Subdomäne abgegeben wird (HERIVAUX *et al.*, 2016). Die zentralen HisKA- und

HATPase\_c-Subdomänen werden mit der REC zu einem Kinase-Modul zusammengefasst. Eine schematische Darstellung der Autophosphorylierung einer HHK zeigt Abbildung 5.

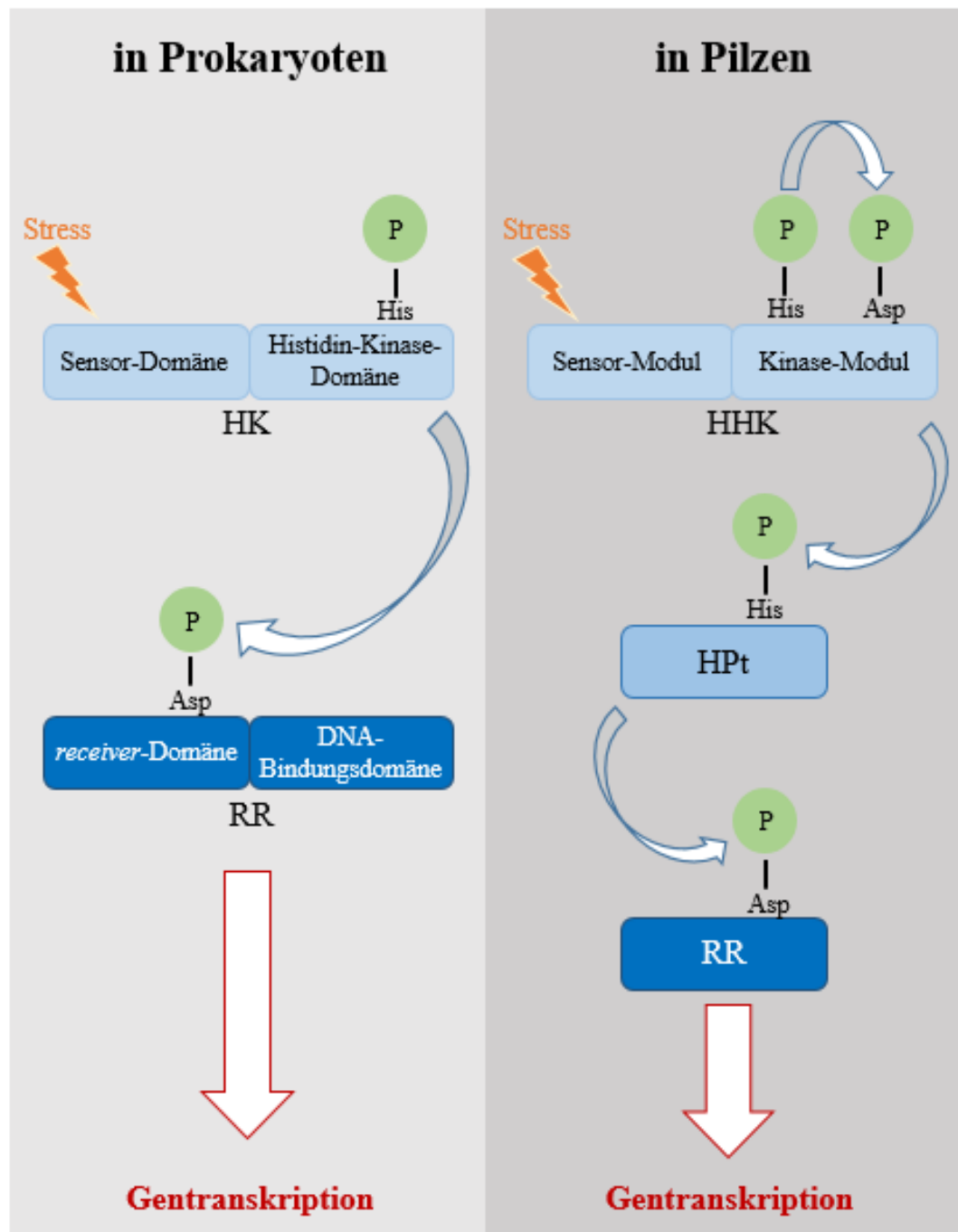


**Abbildung 5: Autophosphorylierung einer Hybrid-Histidin-Kinase**

HisKA: Histidin-Kinase A-Subdomäne  
 HATPase\_c: Histidin-Kinase-ähnliche ATPase-Subdomäne  
 REC: *receiver*-Domäne

Fungale TCS-Signalwege sind mehrstufige *phosphorelay*-Systeme, bei denen HHKs auf die Wahrnehmung externer Stresssignale wie Hyperosmolarität mit Autophosphorylierung reagieren, wodurch ihre Kinaseaktivität moduliert wird. In den meisten Schimmelpilzen führt dies zu einer Aktivierung der Kinase, welche daraufhin einen Histidin-Rest eines ihr im Signalweg nachgeschalteten *histidine phosphotransfer shuttle*-Proteins (Hpt) phosphoryliert. Dieses Protein wirkt als Transmitter und gibt die Phosphatgruppe an einen Aspartat-Rest eines nachgeschalteten RR weiter, welches je nach Typus entweder als aktivierter Transkriptionsfaktor direkten Einfluss auf zelluläre Mechanismen wie die Gentranskription nehmen kann oder als ein Transmitter am weiteren Signalweg beteiligt ist (SHOR & CHAUHAN, 2015). Dieses *phosphorelay*-System, bei welchem die Übertragung einer Phosphatgruppe innerhalb der HHK von Histidin auf Aspartat, weiter auf ein Histidin des Hpt und wiederrum auf ein Aspartat des RR ( $\text{His} \rightarrow \text{Asp} \rightarrow \text{His} \rightarrow \text{Asp}$ ) erfolgt, ist charakteristisch für Pilze und stellt eine mögliche Zielstruktur bei der Entwicklung spezifischer antifungaler Wirkstoffe dar. Diese hätten den Vorteil, dass sie spezifische Zellmechanismen der pathogenen Pilze beeinträchtigen würden, ohne die Aktivität der in Säugetierzellen häufig vorkommenden konventionellen Ser-/Thr-/Tyr-Kinasen zu beeinflussen (SHOR & CHAUHAN, 2015). Abbildung 6 veranschaulicht den Ablauf von TCS-Systemen vergleichend bei Prokaryoten und Pilzen.

## Two component signaling (TCS)-Systeme



**Abbildung 6: Vergleichende Darstellung von TCS-Systemen in Prokaryoten und Pilzen**

modifiziert nach (CATLETT *et al.*, 2003)

HK: Histidin-Kinase

HHK: Hybrid-Histidin-Kinase

RR: *response regulator*-Protein

HPt: *histidine phosphotransfer shuttle*-Protein

HHKs wurden ursprünglich in der Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze) anhand ihres N-terminalen Sensor-Moduls in elf Gruppen (I bis XI) (CATLETT *et al.*, 2003) und in der Abteilung der Basidiomycota (Ständerpilze) in sieben Gruppen (IA, IB, IC, SGD-HK, Fph, STK-HK und Dual-HK) unterteilt (LAVIN *et al.*, 2010). Ein Vergleich der Einteilungssysteme zeigte, dass bei einzelnen Gruppen der beiden Systeme Überschneidungen vorlagen, so dass mittlerweile eine abteilungsübergreifende Einteilung der fungalen HHKs in 16 Gruppen etabliert wurde (DEFOSSE *et al.*, 2015). Viele dieser Proteine sind jedoch bislang noch nicht eingehend auf ihre Funktion hin erforscht. Die Gruppe III-HHKs stellen eine der wenigen näher charakterisierten Gruppen dar. Ihre Aminosäuresequenz ist im Reich der Pilze gut konserviert, kann allerdings auch bei phylogenetisch verwandten Pilzen sehr unterschiedliche Funktionen übernehmen (DEFOSSE *et al.*, 2015). Es wird derzeit diskutiert, inwieweit der spezielle Aufbau ihres Sensor-Moduls eine Bedeutung für die Virulenz des zugehörigen Pilzes hat (DEFOSSE *et al.*, 2015). Der deutlich in Länge und Sequenz variierende N-Terminus von Gruppe III-HHKs ist nämlich für verschiedene Pilzgattungen charakteristisch aufgebaut. Er besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl sogenannter HAMP-Domänen, wobei die Bezeichnung HAMP daher rührt, dass diese Domäne in Histidin-Kinasen, Adenylyl-Cyclasen, Methyl-akzeptierenden Proteinen sowie Phosphatasen vorkommt (ARAVIND & PONTING, 1999). HAMP-Domänen besitzen eine spezifische  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur, wobei die genaue Funktion dieser Faltung noch nicht vollständig geklärt ist. Sie wirken vermutlich als Sensoren für Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls sowie als Inhibitoren einer kontinuierlichen Aktivität der zugehörigen Kinasedomäne (ARAVIND & PONTING, 1999). In Hefen weisen Gruppe III-HHKs 5 HAMP-Domänen auf, in filamentösen Pilzen dagegen meist 6 HAMP-Domänen (SPADINGER & EBEL, 2017). Bei Hefen agieren Gruppe III-HHKs meist als negative Regulatoren, indem ihre Aktivität inhibierend auf die ihnen nachgeschaltete Signalkaskade wirkt (BRANDHORST *et al.*, 2019). Als eine Ausnahme unter den Hefen besitzt die Spezies *Saccharomyces cerevisiae* keine Gruppe III- sondern die Gruppe VI-HHK SLN1p. In dieser Hefe wurde der, ein fungales TCS-System beinhaltende, sogenannte *High Osmolarity Glycerol* (HOG)-Signalweg entdeckt, worauf im nächsten Kapitel dieser Arbeit genauer eingegangen wird. Bei *A. fumigatus* wirkt TcsC, die einzige Gruppe III-HHK der Spezies, wie viele Gruppe III-HHKs filamentöser Pilze als ein positiver Regulator des HOG-Signalwegs. Unter

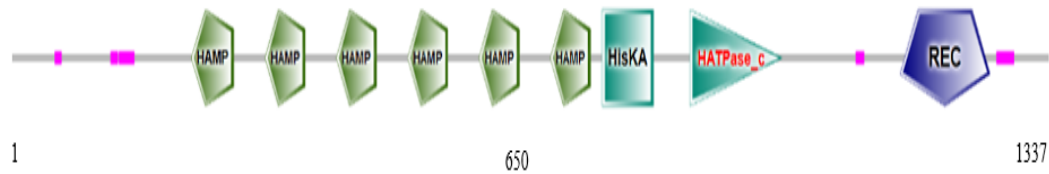
normoosmotischen Bedingungen inhibiert sie durch ihre Inaktivität die ihr nachgeschaltete Signalkaskade (SPADINGER & EBEL, 2017).

Die ersten bei *A. fumigatus* identifizierten und charakterisierten Histidin-Kinasen waren die Gruppe IV-HHKs Fos1, auch TcsA genannt, und TcsB. Die Bezeichnung TcsA beziehungsweise TcsB wurde in Anlehnung an die Funktion der Kinasen innerhalb eines TCS-Systems gewählt. Beide Proteine erwiesen sich bei Studien mit jeweiligen Deletionsmutanten hinsichtlich des Hyphenwachstums sowie der Anpassung des Pilzes an osmotischen und oxidativen Stress als nicht essentiell (POTT *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2006). Die *AtcsA* Mutante ist allerdings resistent gegenüber dem Zellwand-abbauenden Enzym Novozym 234 sowie gegenüber Dicarboximid-Fungiziden wie Iprodione. Diese Erkenntnis ist überraschend, da Dicarboximide normalerweise auf Gruppe III-HHKs einwirken (MCCORMICK *et al.*, 2012) und lässt den Rückschluss zu, dass TcsA eine wichtige Rolle beim Zellwandaufbau einer Hyphe spielt (POTT *et al.*, 2000). Eine weitere HHK in *A. fumigatus* ist den Gruppe III-HHKs zuzuordnen und trägt die Bezeichnung TcsC. Sie ist für die Vermittlung der antifungalen Wirkung von Phenylpyrrolen (wie Fludioxonil) oder Dicarboximiden (wie Iprodion) sowie für das Wachstum des Pilzes unter hyperosmotischen und hypoxischen Bedingungen verantwortlich (MCCORMICK *et al.*, 2012). Interessanterweise konnte durch eine heterologe Expression verschiedener TcsC-ähnlicher Gruppe III-HHKs bei *S. cerevisiae* eine Sensibilität gegenüber Phenylpyrrolen ausgelöst werden, obwohl die Hefe eigentlich durch das Fehlen einer eigenen Gruppe III-HHK nicht für diesen Wirkstoff empfänglich ist (HAGIWARA *et al.*, 2013). Proteine wie TcsC können demnach auch in Pilzen funktionell sein, in denen sie physiologisch nicht vorkommen.

Das Protein TcsC (Afu2g03560) ist aus 1337 Aminosäuren aufgebaut. Das Sensor-Modul am vorderen Teil des Proteins besteht aus einem N-terminalen Abschnitt mit 3 *low complexity regions* sowie 6 HAMP-Domänen. Die erste HAMP-Domäne von TcsC wird bei einer Sequenzanalyse durch das SMART-Onlinetool des *European Molecular Biology Laboratory* für die Aminosäuren 231-286 vorausgesagt, die zweite für die Aminosäuren 326-378, die dritte für die Aminosäuren 418-470, die vierte für die Aminosäuren 510-562, die fünfte für die Aminosäuren 602-654 und die sechste für die Aminosäuren 694-746. Das Kinase-Modul von TcsC besteht wie bei jeder HHK aus einer



HisKA-Subdomäne (TcsC<sub>761-827</sub>), einer HATPase\_c-Subdomäne (TcsC<sub>874-993</sub>) sowie einer REC (TcsC<sub>1145-1261</sub>). Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der Hybrid-Histidin-Kinase TcsC.



**Abbildung 7: Die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC aus *A. fumigatus* (TcsC<sub>1-1337</sub>)**

HAMP:	HAMP-Domäne
HisKA:	Histidin-Kinase A-Subdomäne
HATPase_c:	Histidin-Kinase-ähnliche ATPase-Subdomäne
REC:	<i>receiver</i> -Domäne
pink:	<i>low complexity region</i>

### 3.3. Der High Osmolarity Glycerol (HOG)-Signalweg

Der am besten charakterisierte TCS-Signalweg in Eukaryoten ist ein Bestandteil des osmosensitiven HOG-Signalwegs (HOHMANN, 2002; BAHN, 2008). Entdeckt wurde er in der Hefe *S. cerevisiae*, wo er maßgeblich an der Regulation des zellulären Flüssigkeitshaushaltes unter hyper- und hypoosmotischen Bedingungen beteiligt ist (HOHMANN, 2002). Die Anpassungsreaktion verläuft hauptsächlich über die Modulation der intrazellulären Glycerin-Synthese, worauf die Benennung des *High Osmolarity Glycerol* (HOG)-Signalwegs zurückzuführen ist (BREWSTER *et al.*, 1993). Der HOG-Signalweg ist ein mehrstufiges *phosphorelay*-System, welches neben einem TCS-System bestehend aus der Gruppe VI-HHK SLN1p, dem HPt YPD1p und dem RR SSK1p zusätzlich eine *stress-activated, mitogen-activated protein kinase* (SAPK; MAPK)-Kaskade beinhaltet (HAGIWARA *et al.*, 2013). SLN1p besitzt als transmembranöse HHK eine extrazelluläre Sensor-Domäne, eine zytoplasmatische Histidin-Kinase-Domäne und eine *receiver*-Domäne. Unter normalen, niedrig osmolaren Bedingungen ist SLN1p stets aktiv und autophosphoryliert den Histidin-Rest His<sub>576</sub> der H-Box seiner Histidin-Kinase-Domäne, welcher seinerseits die Phosphatgruppe an den Aspartatrest Asp<sub>1144</sub> in der REC des Proteins weitergibt (MAEDA *et al.*, 1994; TAO *et al.*, 2002). Das aktive SLN1p katalysiert die Phosphorylierung des HPt YPD1p an dessen Histidinrest His<sub>64</sub>, welches im Zuge des Signalwegs seinen Phosphatrest an den Aspartatrest Asp<sub>554</sub> des

zytoplasmatischen RR SSK1p weiterreicht (POSAS *et al.*, 1996). Es liegt dadurch ohne äußere Stresseinwirkung immer phosphoryliertes SSK1p im Zytoplasma der Pilzzelle vor. SLN1p unterdrückt durch die Phosphorylierung von SSK1p die ihm nachgeschaltete Enzymkaskade und wirkt somit in seinem aktiven Zustand als negativer Regulator des HOG-Signalwegs. Erst unter hyperosmotischem Stress, welchen SLN1p über seine extrazelluläre Sensor-Domäne wahrnimmt, wird dessen Kinaseaktivität gestoppt, wodurch es in der Zelle zu einer Akkumulation von nicht-phosphoryliertem SSK1p kommt. Diese Akkumulation aktiviert das dem TCS-System nachgeschaltete sogenannte HOG1 MAPK-Modul, bestehend aus der *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAPKKK) SSK2p, der *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK) PBS2p sowie der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) HOG1p (POSAS & SAITO, 1998). SSK2p besitzt eine N-terminale autoinhibitorische Domäne sowie eine C-terminale Kinase-Domäne. Im Ruhezustand interagieren die beiden Domänen des Proteins miteinander, so dass die Aktivität der Kinase-Domäne unterbunden wird. Akkumuliert jedoch unphosphoryliertes SSK1p in der Zelle, so bindet dieses an die autoinhibitorische Domäne von SSK2p, wodurch die Inhibition der Kinase-Domäne des Proteins zum Erliegen kommt. Daraufhin erfolgt eine Autophosphorylierung eines Threoninrestes in der Kinase-Domäne von SSK2p, wobei es sich höchstwahrscheinlich um den Threoninrest Thr<sub>1460</sub> handelt (POSAS & SAITO, 1998). Die Autophosphorylierung von SSK2p ermöglicht eine Bindung des Proteins an die Kinase-Domäne der MAPKK PBS2p, was deren zweifache Phosphorylierung an einem Serin- sowie einem Threoninrest katalysiert. Das aktivierte PBS2p katalysiert letztlich seinerseits eine zweifache Phosphorylierung der MAPK HOG1p an den Threonin- und Tyrosinresten des bei MAPKs gut konservierten Aminosäurenmotivs TGY (BAHN, 2008). Die Aktivierung des HOG1 MAPK-Moduls ermöglicht es der Hefe, durch Bildung von Glycerin ihren intrazellulären osmotischen Druck zu erhöhen und sich so auf die sie umgebenden hyperosmotischen Bedingungen einzustellen (MAEDA *et al.*, 1994; CATLETT *et al.*, 2003). SLN1-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* sind nicht überlebensfähig, da die übermäßige Akkumulation von nicht-phosphoryliertem SSK1p in einer ungebremsten Erhöhung des intrazellulären osmotischen Drucks durch die stetig aktivierte HOG1 MAPK-Kaskade resultiert. Dies konnte in einer funktionellen Studie mittels einer temperatursensitiven Form von SLN1 gezeigt werden, wobei das Gen bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C nicht mehr exprimiert wird. Bei

einer SLN1-SSK1-Doppeldeletionsmutante ist die letale Wirkung der SLN1-Deletion durch die fehlende Akkumulation von SSK1p wieder aufgehoben (MAEDA *et al.*, 1994). SSK1p spielt demnach keine aktive katalytische Rolle in der Enzymkaskade, sondern übernimmt lediglich eine passive Funktion bei der Aktivierung der nachgeschalteten MAPKKK SSK2p. Mutationen an den phosphorylierbaren Histidin- und Aspartatresten SLN1-H<sub>576</sub> und SLN1-D<sub>1144</sub> wirken sich genau wie SLN1-Deletionsmutationen letal auf den Organismus aus. Solche Mutanten sind aufgrund der Inaktivität ihrer HHK SLN1p und der daraus resultierenden durchgehenden Aktivierung des HOG-Signalwegs nicht überlebensfähig (MAEDA *et al.*, 1994).

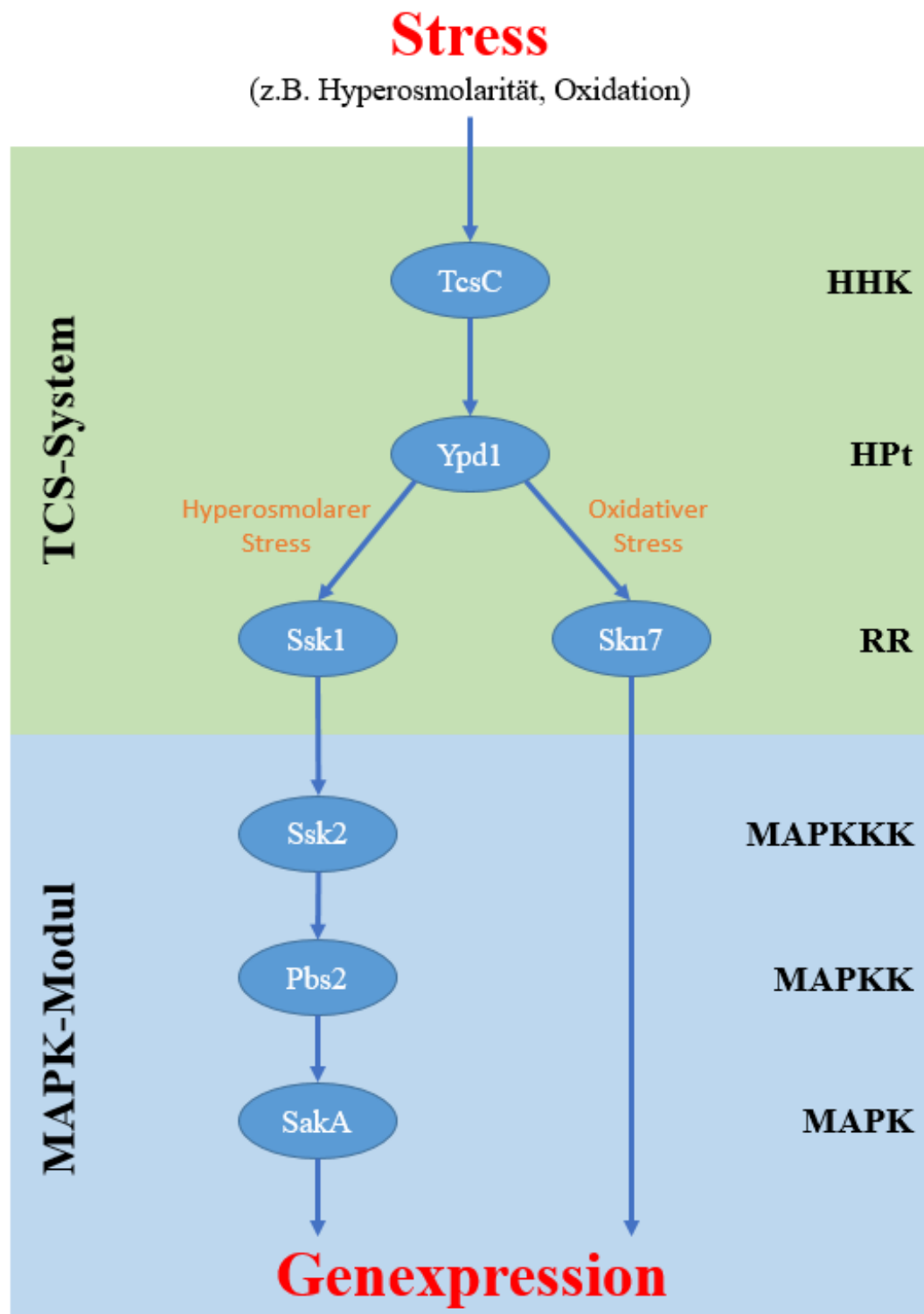
Ein weiteres SLN1p nachgeschaltetes Protein ist der RR SKN7p, welcher als Transkriptionsaktivator Einfluss auf Gene ausübt, die für Reaktionen auf oxidativen Stress sowie Veränderungen in der Zellwand der Hefe verantwortlich sind. Das *phosphorelay*-System, durch welches SKN7p an seinem konservierten Aspartatrest D<sub>427</sub> phosphoryliert und dadurch aktiviert wird, beinhaltet genau wie der HOG-Signalweg das HPt YPD1p. Dieses Protein wirkt als Transmitter einer Phosphatgruppe zwischen den Sensormolekülen SLN1p und SKN7p (LI *et al.*, 1998). Somit sind die HHK SLN1p und das HPt YPD1p in *S. cerevisiae* an zwei unterschiedlichen Signalwegen beteiligt. Über den HOG-Signalweg, welcher über SLN1p in der Aktivierung der MAPK-Kaskade mündet, kann der Pilz sich auf osmotischen Stress einstellen. Über Signalkaskaden mit SKN7p werden Reaktionen auf oxidativen Stress sowie auf Veränderungen in der Zellwand vermittelt, wobei die Reaktion auf oxidativen Stress zwar von der Interaktion zwischen YPD1p und SKN7p abhängt, jedoch nicht von SLN1p. An dieser Reaktion sind andere, bislang nicht charakterisierte Sensormoleküle beteiligt (FASSLER & WEST, 2011).

### **3.4. Ablauf des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus***

In pathogenen Schimmelpilzen spielt der HOG-Signalweg neben seiner Funktion bei der osmotischen Homöostase zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf externe Stressoren wie UV-Strahlung, Schwermetallbelastung, oxidativen Stress, Zellwandschäden und erhöhte Temperaturen (BAHN, 2008; BRUDER NASCIMENTO *et al.*, 2016). Speziell die durch den HOG-Signalweg vermittelte Fähigkeit zur Anpassung an oxidativen Stress wird bei *A. fumigatus* als ein Virulenzfaktor angesehen. Als pathogener Organismus muss der Pilz bei einer

Infektion den reaktiven Sauerstoffverbindungen, die von Immunzellen wie Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet werden, widerstehen können. Für diese Anpassungsreaktion ist der HOG-Signalweg essentiell (LATGE, 1999; DU *et al.*, 2006). Er besteht in *A. fumigatus* aus einem TCS-System, welches neben der Gruppe III-HHK TcsC das HPt Ypd1 und die zwei RR Ssk1 und Skn7 beinhaltet, sowie einem MAPK-Modul (BAHN, 2008). TcsC nimmt dabei Stimuli wie hyperosmotischen Stress aus der Umwelt wahr und wird dadurch aktiviert. Hierin unterscheidet sich die HHK TcsC von der HHK SLN1p in *S. cerevisiae*, welche bei der Wahrnehmung externer Stressoren inaktiv wird. Die Aktivierung von TcsC erfolgt nach Erkennen des Stimulus im Sensor-Modul des Proteins durch eine Autophosphorylierung in seinem Kinase-Modul. TcsC katalysiert im Anschluss die Phosphorylierung des HPt Ypd1, wodurch dieses Protein aktiviert wird. Hier teilt sich der HOG-Pfad in zwei Abschnitte auf, die jeweils Einfluss auf die Genexpression des Pilzes ausüben werden. Im Unterschied zu *S. cerevisiae*, wo der HOG-Signalweg als die Enzymkaskade von SLN1p zu HOG1p definiert ist, ist der HOG-Signalweg in *A. fumigatus* aufgrund des gemeinsamen Sensorproteins TcsC und des nachgeschalteten HPt Ypd1 sowohl für hyperosmotischen als auch hypoxischen Stress verantwortlich (siehe Abbildung 8). Das zu Ypd1 homologe HPt YpdA in *A. nidulans* wurde bereits gut charakterisiert und wird hier hauptsächlich dem osmonsensitiven Teil des HOG-Signalwegs zugeordnet (BAHN, 2008). Über Ypd1 in *A. fumigatus* sind dagegen bislang nur wenig Daten bekannt. Basierend auf Studien mit *S. cerevisiae* kann jedoch folgende Theorie zum Verlauf der Signalkaskade aufgestellt werden: Ypd1 befindet sich im inaktiven Zustand im Zytoplasma des Pilzes. Es transloziert nach Aktivierung durch TcsC aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo es den RR Skn7 durch Phosphorylierung aktiviert. Skn7 wird nun als Transkriptionsaktivator direkt in die Gentranskriptionsprozesse des Pilzes eingreifen und den Organismus auf die veränderten Umweltbedingungen einstellen. Skn7 ist dabei vor allem in Anpassungsreaktionen auf oxidativen Stress involviert (LAMARRE *et al.*, 2007). Ypd1 kann nach Phosphorylierung durch TcsC jedoch auch im Zytoplasma verbleiben, wo es den RR Ssk1 phosphoryliert und somit aktiviert. Ssk1 tritt nach seiner Aktivierung als Vermittler zwischen dem TCS-System und dem MAPK-Modul des HOG-Signalwegs auf. Es interagiert mit der autoinhibitorischen Domäne der MAPKKK Ssk2, welche auf diese Interaktion mit einem Umfaltungsprozess reagiert, der ihre Ser-/Thr-Kinase-Domäne freilegt. Diese

Domäne kann sich nun an ihrem Threoninrest autophosphorylieren. Die aktivierte MAPKKK Ssk2 katalysiert die Phosphorylierung eines Serin- und Threoninrestes der ihr in der Enzymkaskade nachgeschalteten MAPKK Pbs2, welche anschließend ihrerseits die zweifache Phosphorylierung der MAPK SakA, dem zu HOG1p in *S. cerevisiae* homologen Protein in *A. fumigatus*, an einem Threonin- und Tyrosinrest katalysiert (BAHN, 2008). SakA wandert nach Aktivierung durch die MAPK-Kaskade aus dem Zytoplasma in den Zellkern und wirkt dort wie das Protein Skn7 auf die Gentranskriptionsprozesse ein (SANTOS & SHIOZAKI, 2001; BAHN, 2008; BRUDER NASCIMENTO *et al.*, 2016). Eine Translokation äquivalent zu SakA in *A. fumigatus* kann in *S. cerevisiae* durch die MAPK Hog1 sowie bei dem Pflanzenschädling *Colletotrichum lagenarium* durch die MAPK Osc1 beobachtet werden, welche beide nach Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandern (KOJIMA *et al.*, 2004). Abbildung 8 stellt den Ablauf des HOG-Signalwegs schematisch dar.



**Abbildung 8: Ablauf des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus***

modifiziert nach (BAHN, 2008)

HHK: Hybrid-Histidin-Kinase

HPt: *histidine phosphotransfer shuttle*-Protein

RR: *response regulator*-Protein

MAPKKK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase

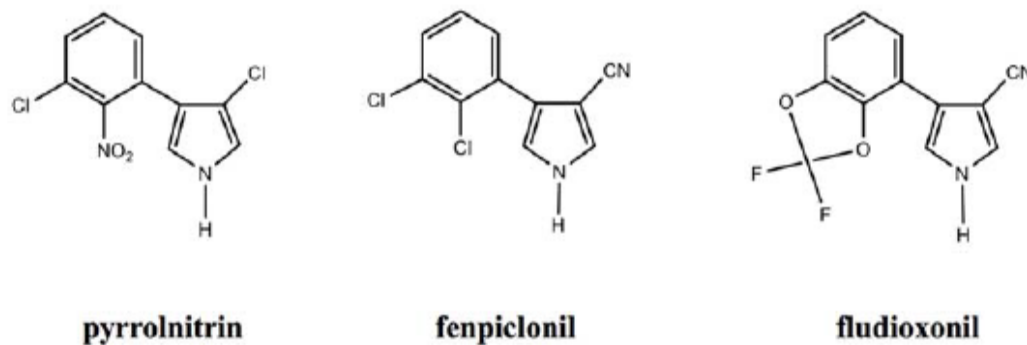
MAPKK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase

MAPK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase

Der Einfluss von Skn7 und SakA auf die fungalen Transkriptionsprozesse führt je nach Art des aktivierenden Stressors zu unterschiedlichen Anpassungsreaktionen. Bei der Anpassung an externen hyperosmotischen Druck werden beispielsweise bestimmte Zielgene, die Proteine wie die in die zelluläre Glycerin-Synthese involvierte Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase codieren, vermehrt exprimiert (BAHN, 2008). Glycerin ist ein osmotisch wirksames Molekül, welches nach Einlagerung in das Zytoplasma das osmotische Gefälle zwischen der Hyphe und ihrer Umgebung ausgleicht und somit einem Flüssigkeitsentzug und einer daraus resultierenden Austrocknung der Pilzzelle entgegenwirkt. Bei einem Ausbleiben der Stresssignale wird die MAPK SakA im Sinne einer negativen *feedback*-Regulation wieder durch spezifische Phosphatasen dephosphoryliert und aus dem Zellkern entfernt (BAHN, 2008).

### 3.5. Künstliche Aktivierung des HOG-Signalwegs

Der HOG-Signalweg ist für Pilze unter Stresssituationen eine wichtige Signalkaskade, stellt jedoch auch eine Achilles-Sehne für den Organismus dar. Bei einer künstlichen Aktivierung führt er durch eine Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts und dem daraus resultierenden Einstrom von Wasser in das Zytoplasma zu einer starken Schädigung des Pilzes. Diese Wirkung kann durch antimykotische Wirkstoffe wie die Phenylpyrrole Fenpiclonil und Fludioxonil, Derivate des von Bakterien wie *Pseudomonas pyrrocinia* produzierten Tryptophan-Metaboliten Pyrrolnitrin, hervorgerufen werden. Diese Substanzen werden in der Landwirtschaft häufig als Pflanzenschutzmittel gegen pflanzenpathogene Pilze wie *Fusarium* spp. oder *Botrytis* spp. eingesetzt, wobei hier vor allem Fludioxonil dank seiner erhöhten Stabilität und Aktivität Anwendung findet (KILANI & FILLINGER, 2016). Abbildung 9 zeigt die Strukturformel von Pyrrolnitrin sowie dessen chemischen Analoga Fenpiclonil und Fludioxonil.



**Abbildung 9: Strukturformel des chemischen Stoffes Pyrrolnitrin sowie dessen Derivaten Fenpiclonil und Fludioxonil**

(KILANI & FILLINGER, 2016)

Fludioxonil imitiert durch eine Aktivierung von Gruppe III-HHKs und der daraus resultierenden rapiden Phosphorylierung von MAPKs einen externen hyperosmolaren Druck, was zu einem osmotischen Ungleichgewicht mit massiver Wasseraufnahme und daraus resultierendem Anschwellen bis hin zum Platzen der Zellen führt. Bei *A. fumigatus* nimmt Fludioxonil Einfluss auf die Gruppe III-HHK TcsC. In mit diesem Wirkstoff behandelten Hyphen tritt neben dem Anschwellen der Zellen durch einen sofortigen Wachstumsstopp zusätzlich ein fungistatischer Effekt ein. Zudem führt die Behandlung mit dem Phenylpyrrolderivat zu einer abnorm hohen Anzahl an Zellkernen sowie zu einer verstärkten Septierung der Hyphen und einer Restrukturierung der Zellwand (MCCORMICK *et al.*, 2012; KILANI & FILLINGER, 2016; WIEDEMANN *et al.*, 2016). Ab einer Einwirkzeit von circa 72 Stunden wirkt Fludioxonil auf *A. fumigatus* durch eine starke Schädigung der Hyphen bis hin zur Lyse der Zellwände fungizid (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Bei einer kürzeren Einwirkzeit ist seine Wirkung allerdings potentiell reversibel, nach Entfernen der Substanz kann sich der Pilz wieder erholen und sein normales Wachstum aufnehmen (MCCORMICK *et al.*, 2012). Pilze können auch eine natürliche Resistenz gegenüber Fludioxonil entwickeln, solche Mutationen sind jedoch aufgrund der daraus resultierenden erhöhten Anfälligkeit des Organismus gegenüber hyperosmotischem Stress nicht sehr häufig (KILANI & FILLINGER, 2016).

#### 4. Lokalisation von TcsC

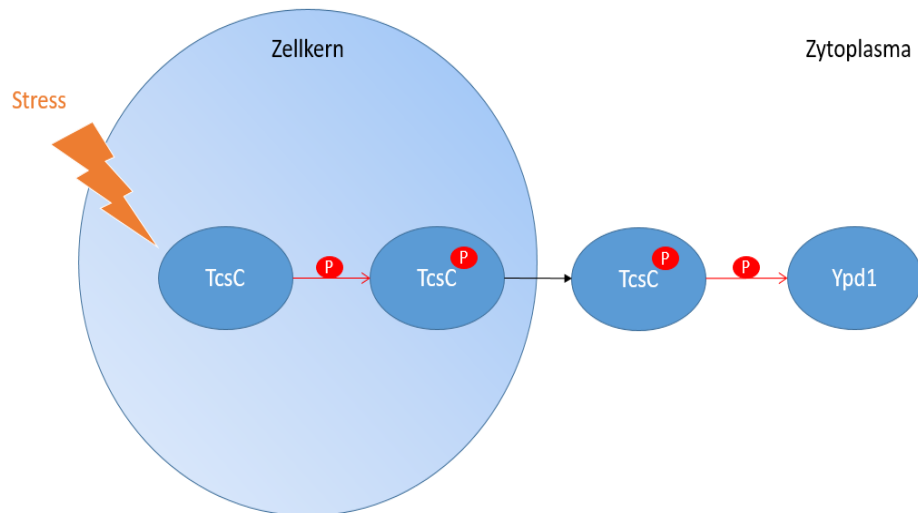
Aufgrund der Funktion von TcsC bei der Anpassung des Pilzes an seine äußere Umgebung läge die Vermutung nahe, dass das Protein in der Zellmembran



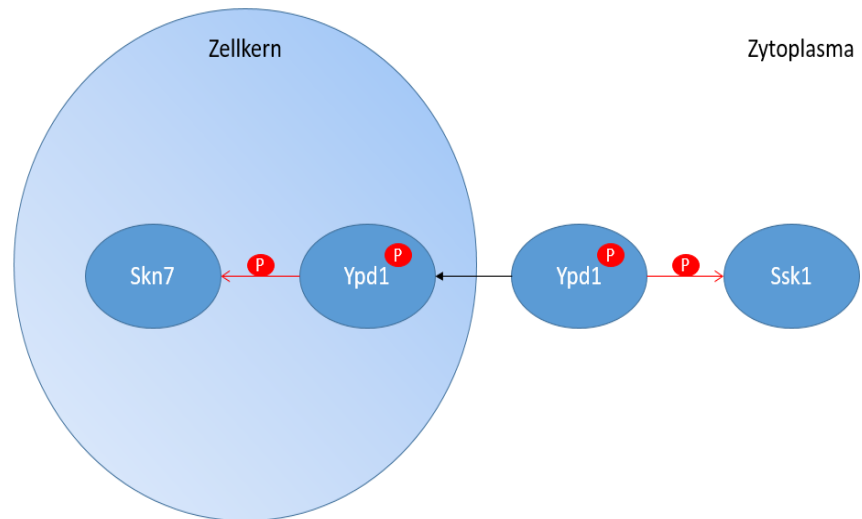
verankert ist, wo es als Sensor-Molekül des HOG-Signalwegs in direktem Kontakt zur Umwelt stünde. So verhält es sich bei der HHK SLN1p in *S. cerevisiae*, wobei SLN1p jedoch als ein Sonderfall unter den Sensor-Proteinen des HOG-Signalwegs nicht der Gruppe III- sondern der Gruppe VI-HHKs zugehörig ist (BRANDHORST *et al.*, 2019). Das Membranprotein SLN1p ist dank zwei N-terminaler Transmembran-Domänen in die Zellmembran integriert und wirkt in *S. cerevisiae* äquivalent zu TcsC, in dem es hyper- und hypoosmotischen Stress wahrnimmt und diese Information mittels des HOG-Signalwegs weiterleitet (TAO *et al.*, 2002). Die Lokalisation von SLN1p in der Zellmembran des Pilzes spielt dabei eine bedeutende Rolle. Hyperosmolarer Stress und andere Bedingungen, die einen reduzierten Zellwandturgor hervorrufen, führen, vermutlich aufgrund einer direkten Verbindung zwischen SLN1p und der Zellwand, zu einer Reduktion der SLN1p-Kinaseaktivität (FASSLER & WEST, 2011). *A. fumigatus* besitzt mit TcsB ebenfalls eine transmembranöse Gruppe VI-HHK, welche allerdings keine Rolle bei der Adaption an oxidativen Stress spielt (DU *et al.*, 2006). Studien mit Fusionsproteinen bestehend aus dem grün fluoreszierenden Protein GFP, einem Derivat eines ursprünglich aus dem Tintenfisch *Aequorea victoria* gewonnenen grün autofluoreszierenden Proteins (SPELLIG *et al.*, 1996), und am N-Terminus unterschiedlich stark verkürzten TcsC-Molekülen ergaben, dass sich solche Fusionsproteine stets im Zytoplasma befinden (SPADINGER & EBEL, 2017). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Tatsache, dass allen Gruppe III-HHKs im Unterschied zu Gruppe VI-HHKs aufgrund fehlender transmembranöser Lokalisationsdomänen im Ruhezustand eine nukleozytoplasmatische Lokalisation zugeschrieben wird. Wie genau sich diese Hybrid-Histidin-Kinasen nach ihrer Aktivierung in Bezug auf ihre Lokalisation verhalten, ist jedoch derzeit noch nicht ausreichend erforscht (DEFOSSE *et al.*, 2015).

Es konnte angenommen werden, dass TcsC zumindest im inaktiven Zustand im Zytoplasma zu finden ist. Nicht publizierte Daten von Dr. Anja Spadinger deuteten jedoch darauf hin, dass sich TcsC wider Erwarten im inaktiven Zustand im Zellkern befindet. Erst eine Aktivierung des Proteins führt zu einer Lokalisation im Zytoplasma. Eine schematische Darstellung der Lokalisationen der bei *A. fumigatus* in den HOG-Signalweg involvierten Proteine zeigt Abbildung 10. Die Abbildung beruht auf fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von GFP-Fusionsproteinen.

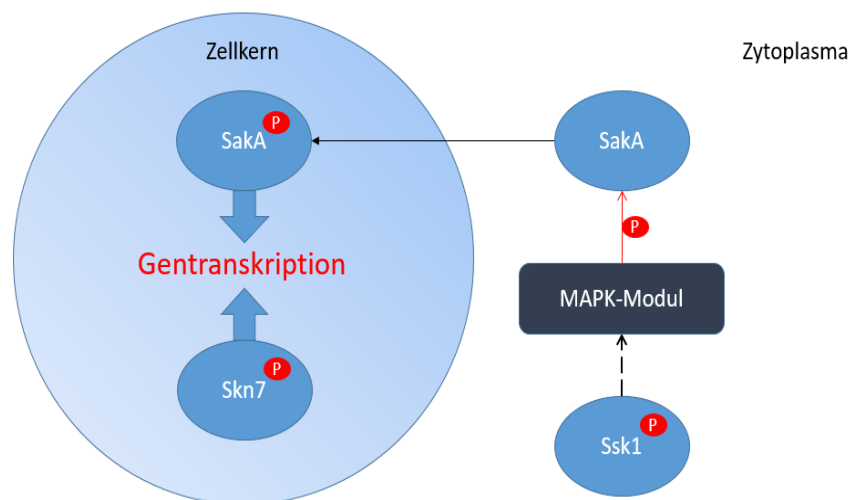
1)



2)



3)



**Abbildung 10: Ablauf des HOG-Signalwegs mit schematischer Lokalisation der beteiligten Proteine innerhalb einer Zelle von *A. fumigatus***

Da bisherige Studien eine zytoplasmatische Lokalisation von am N-Terminus verkürzten TcsC-Molekülen zeigten, konnte nun die Hypothese aufgestellt werden, dass die Verkürzung des Proteins am N-Terminus zu einem Verlust seiner Zellkernlokalisation geführt hatte. Der N-terminale Bereich von TcsC könnte demnach eine sogenannte *nuclear localization site* beinhalten, welche mithilfe ihrer Aminosäuresequenz die Zellkernlokalisation des TcsC-Proteins hervorruft.

## 5. TcsC und NikA auf Gensequenzebene

TcsC und NikA (AN4479) sind homologe Gruppe III-HHKs des pathogenen Schimmelpilzes *A. fumigatus* und der weniger pathogenen Spezies *A. nidulans*. Ein Alignment beider Aminosäuresequenzen über das Online-Tool Clustal Omega der Firma EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ergibt für die volle Länge der Proteine 87 % identische Aminosäuren. Vergleicht man allerdings nur den N-terminalen Bereich der Sequenzen, so weisen die homologen Proteine deutliche Unterschiede auf. Die Prozentzahl der identischen Paarungen beträgt bei den Aminosäuren 1-208 des Proteins TcsC im Alignment mit den Aminosäuren 1-170 des Proteins NikA lediglich 45 %. Diese Inkonsistenz ist auch im direkten Aminosäuresequenz-Alignment, wie in Abbildung 11 dargestellt, eindrucklich. Ein Vergleich weiterer zu TcsC homologer Proteine anderer *Aspergillus*-Spezies zeigt ebenfalls starke Homologien im gesamten Protein sowie auffällige Variationen der N-terminalen Aminosäuresequenzen (siehe Anhang Abbildung A 1).



dadurch statt, dass NimA seine Position an der Septumspore verlässt und in die Zellkernperipherie des apikalen Kompartiments transloziert. Die Septumspore verschließt sich daraufhin und die Zellkernteilung wird initiiert. Nach Abschluss der Mitose kehrt NimA zur Septumspore zurück, wodurch diese geöffnet wird und die Zellkompartimente erneut in Interaktion treten (SHEN *et al.*, 2014). Das homologe NimA-Protein in *A. fumigatus* (Afu6g02670) weist ebenfalls eine Lokalisation an den Septen einer Hyphe auf und auch dieses Protein verlässt seine Position im Zuge einer Mitose. Dies zeigten Studien an AfS35, wobei unter dem Einfluss von Fludioxonil vermehrt Mitosen stattfanden und daraufhin durch das Fehlen von NimA an der Septumspore ein Verschluss der Septen auftrat (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde das Protein NimA in AfS35 hinsichtlich seiner für die Lokalisation an den Septen einer Hyphe verantwortlichen Genabschnitte untersucht. Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung des Proteins NimA aus *A. fumigatus*.



**Abbildung 12: Das Protein NimA aus *A. fumigatus* (NimA<sub>1-700</sub>)**

S\_TKc: katalytische Tyrosin-Kinase-Domäne  
grün: *coiled coil region*  
pink: *low complexity region*

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Materialien, Enzyme und Chemikalien

Sofern nicht anderweitig genannt, wurden Geräte, Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen und Laborutensilien der Firmen Thermo Fisher Scientific (Ulm) und Sarstedt (Nümbrecht) verwendet. Die verwendeten Enzyme stammten, wenn nicht anderweitig genannt, von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt) und Thermo Fisher Scientific (Ulm). Chemikalien stammten, wenn nicht anders benannt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Carl Roth (Karlsruhe).

#### 2. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

##### 2.1. Organismen

Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm war *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  mit dem Genotyp F  $\phi$ 80d, lacZ  $\Delta$ M15, endA1, recA1, hsdR17(rK-mK-), supE44, thi-1,  $\lambda$ -, gyrA96, relA,  $\Delta$ (lacZYA-, argF)U169 (HANAHAHAN, 1983).

Die in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme sind im Anhang (Tabelle A 1 und A 2) aufgeführt. Bei der Expression eines verkürzten Proteines in einem Pilzstamm wurden die im Konstrukt beinhalteten Aminosäureziffern tiefgestellt aufgezählt. Beispielsweise exprimiert der Stamm AfS35 *gfp-tcsC*<sub>1-208</sub> ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und den Aminosäuren 1-208 von TcsC.

##### 2.2. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Anhang (Tabelle A 3) aufgeführt.

##### 2.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang (Tabelle A 4 und A 5) aufgeführt.

##### 2.4. Plasmidkonstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidkonstrukte sind im Anhang (Tabelle A 6 und A 7) aufgeführt. Bei der Verkürzung eines Proteinabschnittes wurden die im Konstrukt beinhalteten Aminosäureziffern tiefgestellt aufgezählt. Beispielsweise beinhaltet das Plasmidkonstrukt pSK379 *gfp-tcsC*<sub>1-208</sub> die genetische Information

eines Fusionsproteins bestehend aus GFP und den Aminosäuren 1-208 von TcsC. Viele der im Zuge dieser Arbeit hergestellten Plasmidkonstrukte beinhalten das grün fluoreszierende Protein GFP oder das rot fluoreszierende Protein RFP. Sowohl GFP als auch RFP sind Derivate eines ursprünglich aus dem Tintenfisch *Aequorea victoria* gewonnenen grün autofluoreszierenden Proteins (SPELLIG *et al.*, 1996).

### 3. Zellanzucht

#### 3.1. Medien

Alle Medien wurden, wenn nicht anders genannt, bei 121 °C und 3 bar Überdruck für 20 min autoklaviert.

##### 3.1.1. Luria Bertani-Medium für *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* fand in Luria Bertani (HARTMANN *et al.*)-Flüssigmedium statt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 12 g Bactoagar pro Liter Medium [1,2 % (w/v)] versetzt. Für eine Anzucht unter selektiven Bedingungen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren der Selektionsmarker Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g

**Tabelle 1: Inhaltsstoffe des LB-Flüssigmediums**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Bactoagar	12 g [1,2% (w/v)]

**Tabelle 2: Inhaltsstoffe des LB-Agars**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

### 3.1.2. Medien für *A. fumigatus* und *A. nidulans*

*A. fumigatus*- und *A. nidulans*-Stämme wurden mit den folgenden Nährmedien angezogen.

#### 3.1.2.1. *Aspergillus* Minimal-Medium (HILL & KAUFER, 2001)

*Aspergillus* Minimal-Medium (AMM) wurde als Flüssigmedium steril aus autoklavierten Lösungen hergestellt, es erfolgte keine weitere Autoklavierung des fertiggestellten Mediums. Als Stickstoffquelle wurde Ammonium-Tartrat ( $C_4H_{12}N_2O_6$ ) verwendet. Der pH-Wert des Mediums lag bei ca. 6,6 und musste nicht eingestellt werden. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 20 g Agar pro Liter Medium [2 % (w/v)] versetzt und anschließend autoklaviert. Zur Anzucht unter selektiven Bedingungen wurde nach Herstellung des Flüssigmediums beziehungsweise nach Autoklavierung und Abkühlung des Agars auf ca. 50 °C der gewünschte Selektionsmarker zugegeben.

20x Salzlösung	50 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 ml (Endkonzentration: 2 mM)
Spurenelementlösung	1 ml
40 % D-Glucose	25 ml
C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10 ml (Endkonzentration: 20 mM)

**Tabelle 3: Inhaltsstoffe des AMM-Flüssigmediums**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

20x Salzlösung	50 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 ml (Endkonzentration: 2 mM)
Spurenelementlösung	1 ml
C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10 ml (Endkonzentration: 20 mM)

**Tabelle 4: Inhaltsstoffe des 2x AMM-Flüssigmediums ohne Glucose**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 500 ml gelöst.



20x Salzlösung	50 ml
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	5 ml (Endkonzentration: 2 mM)
Spurenelementlösung	1 ml
40 % D-Glucose	25 ml
C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10 ml (Endkonzentration: 20 mM)
Agar	20 g

**Tabelle 5: Inhaltsstoffe des AMM-Agars**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

KCl	10,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,9 g

**Tabelle 6: Inhaltsstoffe der 20x Salzlösung (ohne MgSO<sub>4</sub> und ohne Stickstoffquelle)**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

MgSO <sub>4</sub>	52 g
-------------------	------

**Tabelle 7: Inhaltsstoff der MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O-Lösung (0,4 M)**

Der Inhaltsstoff wurde in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 500 ml gelöst.

ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	2,2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,1 g
MgCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	500 mg
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	500 mg
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	160 mg
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	160 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x4H <sub>2</sub> O	110 mg
Na <sub>4</sub> EDTAx4H <sub>2</sub> O	6 g

**Tabelle 8: Inhaltsstoffe der Spurenelementlösung (nach Hunter) (HILL & KAUFER, 2001)**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst. Nach Fertigstellung der Lösung wurde diese nicht autoklaviert, sondern nach steriler Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm Porendurchmesser) zu je 1 ml aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

20x Salzlösung	50 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 ml (Endkonzentration: 2 mM)
Spurenelementlösung	1 ml
2 % Xylose	50 ml
C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	10 ml (Endkonzentration: 20 mM)
Agar	20 g

**Tabelle 9: Inhaltsstoffe des AMM-Xylose-Agars**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

### 3.1.2.2. Sabouraud-Dextrose-Medium

Als Flüssigmedium wurde Sabouraud-Dextrose-Medium nach Herstellerempfehlung mit demineralisiertem Wasser gemischt und autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 15 g Bactoagar pro Liter Medium [1,5 % (w/v)] versetzt.

Neopepton	20 g
Dextrose	40 g

**Tabelle 10: Inhaltsstoffe des Sabouraud-Dextrose-Flüssigmediums**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

Neopepton	20 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g

**Tabelle 11: Inhaltsstoffe des Sabouraud-Dextrose-Agars**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 1000 ml gelöst.

### 3.1.2.3. Sorbitol-Agar

Bei Transformationen von *A. fumigatus* und *A. nidulans* wurde als Anzuchtmedium Sorbitol-Softagar auf Sorbitol-Agarplatten verwendet. Bei Versuchen mit *A. nidulans* wurde dem Nährmedium in demineralisiertem Wasser gelöstes Biotin mit einer Endkonzentration von 0,02 µg/ml zugesetzt. Zur Anzucht unter selektiven Bedingungen wurde nach Autoklavierung und Abkühlung des Agars auf ca. 50 °C der jeweilige Selektionsmarker (Pyrimethamin bzw. Hygromycin, siehe Abschnitt 3.2., Tabelle 14) zugegeben.

Sorbitol	109 g
2x AMM ohne Glucose	250 ml
Agar	10 g

**Tabelle 12: Inhaltsstoffe des Sorbitol-Agars (1,2 M)**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 500 ml gelöst.

Sorbitol	109 g
2x AMM ohne Glucose	250 ml
Agar	3,5 g

**Tabelle 13: Inhaltsstoffe des Sorbitol-Softagars (1,2 M)**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 500 ml gelöst.

### 3.2. Selektionsmarker und Stressoren

Zur Anzucht unter selektiven Bedingungen wurden dem jeweiligen Nährmedium entsprechende Selektionsmarker zugesetzt. Zur Untersuchung der Pilzstämmen unter Stressbedingungen wurden dem jeweiligen Nährmedium entsprechende Stressoren zugesetzt.

Selektionsmarker	Konzentration	Gelöst in
Ampicillin	100 µg/ml	demineralisiertem Wasser
Pyrithiamin	0,1 µg/ml	98 % unvergälltem Ethanol
Hygromycin B (Firma InvivoGen)	200 µg/ml	-

**Tabelle 14: Konzentrationen der eingesetzten Selektionsmarker**

Stressor	Konzentration	Gelöst in
Fludioxonil	1 µg/ml	98 % unvergälltem Ethanol
Kongorot	20 µg/ml	98 % unvergälltem Ethanol
Natriumchlorid	1 M	-
Sorbitol	1,2 M	-

**Tabelle 15: Konzentrationen der eingesetzten Stressoren**

### **3.3. Anzucht von *E. coli***

Als Flüssigkultur wurden *E. coli* über Nacht bei 37 °C in Erlenmeyerkolben unterschiedlicher Größe in einem Schüttelinkubator mit 140 rpm angezogen. Für eine langfristige Lagerung wurde nach Aliquotierung von je 700 µl einer Übernachtskultur jedes Aliquot mit 300 µl Glycerin [50 % (v/v)] versetzt und bei - 80 °C gelagert. Auf Agarplatten wurden die Bakterien in einem Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.4. Anzucht von *A. fumigatus* und *A. nidulans***

#### **3.4.1. Anzucht als Flüssigkultur**

Als Flüssigkultur wurden Sporen von *A. fumigatus* oder *A. nidulans* aerob in flüssigem Nährmedium über Nacht bei 37 °C in Erlenmeyerkolben unterschiedlicher Größe, je nach Bedarf mit oder ohne Schikane, in einem Schüttelinkubator mit 140 rpm angezogen.

#### **3.4.2. Anzucht in 24-Well-Platten**

Zur mikroskopischen Untersuchung von Pilzhypen wurde in einer 24-Well-Platte auf sterilen Glasplättchen flüssiges Nährmedium mit der gewünschten Sporensuspension beimpft und über Nacht in einem Brutschrank bei 30 - 37 °C inkubiert.

#### **3.4.3. Anzucht in Zellkulturflaschen zur Herstellung einer Sporenstammsuspension**

Für die Herstellung von Sporenstammsuspension wurden 100 µl einer Sporensuspension in einer Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, in der sich 50 ml Nähragar befanden, pipettiert. Nach Zugabe von sterilen Glaskügelchen wurde die Sporensuspension durch Schwenken auf der Agaroberfläche verteilt. Nach einer Inkubation bei 37 °C über etwa 3 d bildete sich ein sporulierender Pilzrasen aus, woraufhin die Sporen abgeerntet wurden. Hierfür wurden sterile Glaskügelchen sowie 10 ml steriles, demineralisiertes Wasser in die Zellkulturflasche gegeben. Durch Schütteln und Schwenken wurden die Sporen von den Konidiophoren gelöst und die Sporensuspension anschließend durch sterile Miracloth-Filter der Firma Merck filtriert, wobei die Sporen von Hyphen- und Agarrückständen getrennt wurden. Die Konzentration der Sporenstammsuspension wurde bestimmt, indem mithilfe eines Ultrospec10 Zelldichte-Messgerätes der

Firma Amersham Biosciences bei 600 nm die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) einer verdünnten Sporensuspension gemessen und anhand der  $OD_{600}$  unter Berücksichtigung des verwendeten Verdünnungsfaktors die Konzentration an Sporen pro Milliliter Sporensuspension errechnet wurde. Die Berechnung erfolgte dabei wie folgt:

$$OD_{600} \times 2,24 \times 10^7 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Sporen/ml.}$$

Die Lagerung der Sporenstammssuspension erfolgte mittelfristig bei 4 °C als Aliquot in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Für eine langfristige Lagerung wurde die Suspension in ein Mikrobank-Reaktionsgefäß der Firma Pro-Lab Diagnostics pipettiert, woraufhin sich die Sporen während einer Inkubation bei Raumtemperatur über 30 min an die in der Mikrobank enthaltenen porösen Glaskugeln anlagerten. Nach erfolgter Inkubation wurde das überschüssige Medium verworfen und die Mikrobank bei - 80 °C aufbewahrt.

#### **3.4.4. Untersuchungen auf Agarplatten**

Bei einem Tüpfeltest (*Drop Dilution Assay*) wurden frisch geerntete Sporensuspensionen nach Ermittlung der Sporenkonzentration in einer 10er Potenz-Verdünnungsreihe beginnend bei  $5 \times 10^7$  Sporen/ml als Spots à 1 µl auf eine mit dem jeweiligen Stressor versetzte Agarplatte pipettiert (siehe Abschnitt 3.2. Tabelle 15) und in einem Brutschrank bei 30 - 37 °C für 42 h inkubiert.

Bei einem Agardiffusionstest wurden  $1 \times 10^5$  frische Sporen auf eine Agarplatte ausgestrichen und mittig ein steriles Watteplättchen aufgelegt. Auf das Plättchen wurden als Stressor 7 µg Fludioxonil, in 98 % unvergälltem Ethanol gelöst, aufgetragen und die Platte in einem Brutschrank bei 37 °C für 42 - 72 h inkubiert.

Bei beiden Tests wurde stets zusätzlich eine Kontrollplatte ohne Stressor angefertigt, um das Wachstum des untersuchten Stammes unter günstigen Bedingungen zu dokumentieren.

## 4. Molekularbiologische und genetische Methoden

### 4.1. Amplifizierung von DNS-Fragmenten

Die Amplifizierung von DNS-Fragmenten erfolgte per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (MULLIS *et al.*, 1986) mittels einer *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* mit zugehörigem Puffersystem. Bei Amplifikaten mit einer Länge von über 6000 Basenpaaren wurde ein *Q5® Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix* eingesetzt. Das Probenvolumen betrug 25 - 50 µl, wobei für rein analytische Zwecke das geringere Volumen eingesetzt wurde. Die benötigten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion bestellt. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem *Mastercycler PRO* der Firma Eppendorf. Elongationstemperatur und -dauer richteten sich nach dem empfohlenen Herstellerprotokoll. Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide wurde mithilfe des *New England Biolabs Inc. Tm-Calculator v 1.9.13* (<http://tmcalculator.neb.com/#!/main>) bestimmt.

Ein beispielhaftes PCR-Programm gestaltet sich wie folgt: Die initiale Denaturierung erfolgt bei 95 °C für 2 min. Daraufhin folgen 30 Wiederholungen der folgenden 3 Schritte: 95 °C für 30 s (Denaturierung), 61 °C für 30 s (Anlagerung der Oligonukleotide), 72 °C für 1 min/1 kB (Elongation). Nach Beendigung der 30 Zyklen wird die Probe für 4 min auf 72 °C (finale Elongation) erhitzt und anschließend im Gerät auf 4 °C abgekühlt.

Das PCR-Produkt wurde mittelfristig bei 4 °C oder langfristig bei - 20 °C gelagert. Bei Bedarf wurde die Probe mithilfe eines *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* der Firma Promega nach vom Hersteller empfohlenem Protokoll gereinigt.

### 4.2. Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Plasmid-DNS wurde mithilfe eines *PureYield™ Plasmid Midiprep Systems* der Firma Promega nach empfohlenem Protokoll aus *E. coli* gewonnen.

### 4.3. Isolierung genomischer DNS aus *A. fumigatus* und *A. nidulans*

Die Isolierung genomischer DNS aus Pilzen erfolgte mithilfe des *MasterPure™ Yeast DNA Purification Kits* der Firma Epicentre. In einer 50 ml-Flüssigkultur gewachsenes Myzel wurde geerntet, indem das Myzel mittels eines sterilen Miraclothfilters von dem flüssigen Medium getrennt wurde. Nach Waschen mit demineralisiertem Wasser wurde eine Spatelspitze des Myzels steril in ein *DNA-Lysing Matrix Tube* der Firma MP Biomedicals gegeben, in welches bereits

225 µl *Yeast Cell Lysis Solution* vorgelegt wurden. Über den Schüttelhomogenisator *FastPrep 24* der Firma MP Biomedicals erfolgte ein mechanischer Aufschluss der Zellen, wobei die Probe bei 6 m/s für 40 s geschüttelt wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 65 °C. Nach einer Abkühlung auf Eis über 5 min wurden 112,5 µl *MPC Protein Precipitation Reagent* zugegeben und die Probe im Anschluss für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die darin gelöste DNS durch Zugabe von 375 µl Isopropanol, nachfolgendem Invertieren sowie einer Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm ausgefällt und der Überstand anschließend verworfen. Das Sediment wurde mit 500 µl gekühltem 70% (v/v) Ethanol versetzt und für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe bei 50 °C getrocknet, um verbliebene Ethanol-Rückstände zu entfernen. Die trockene DNS wurde in 100 µl demineralisiertem und mit 0,2 µl RNase A versetztem Wasser gelöst und bei - 20 °C gelagert.

#### **4.4. Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen**

Die Bestimmung der Konzentration von DNS in Lösungen erfolgte mithilfe eines NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers.

#### **4.5. Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei betrug die verwendete Agarosekonzentration 1 % (w/v) in 1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) der Firma AppliChem. Zur Darstellung der DNS-Fragmente nach der Gelelektrophorese wurden 100 ml Agarosegel mit 4 µl des fluoreszierenden Farbstoffes *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (10.000X in water)* der Firma Biotium versetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die zu untersuchenden Proben zur farblichen Markierung sowie zur Erhöhung der Dichte der Lösung im Verhältnis 1:6 mit einem Ladepuffer (*6x Loading Dye*) versetzt. Als DNS-Längenstandard wurde *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* verwendet. Das Gel wurde in einer Gelelektrophoresekammer für 70 min bei 140 Volt mit TAE als Laufpuffer gefahren und die DNS-Banden im Anschluss auf einem UV-Transilluminator der Serie *UVP GelStudio* der Firma Analytik Jena mit einer Wellenlänge von 320 nm dargestellt und fotografiert. Mithilfe des verwendeten DNS-Längenstandards konnte die Größe der untersuchten DNS-Fragmente

abgeschätzt werden.

#### **4.6. DNS-Extraktion aus einem Agarosegel**

Die Extraktion von DNS aus Agarosegelen erfolgte mithilfe des *PrepEase Gel Extraction Kits* der Firma USB anhand des vom Hersteller empfohlenen Protokolls.

#### **4.7. Enzymatische Behandlung von DNS**

##### **4.7.1. Sequenzspezifische Spaltung von DNS**

Eine sequenzspezifische Spaltung von DNS wurde mithilfe von Restriktionsendonukleasen mit entsprechendem Puffersystem und nach vom Hersteller empfohlenem Protokoll durchgeführt. Im Anschluss wurde die Probe mithilfe eines *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* der Firma Promega nach vom Hersteller empfohlenem Protokoll gereinigt und mittels Gelelektrophorese auf eine vollständig abgelaufene Spaltungsreaktion hin kontrolliert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme waren HindIII, KpnI, SpeI, NsiI, PmeI und EcoRV.

##### **4.7.2. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten**

Eine Phosphorylierung am 5'-Ende von DNS-Fragmenten erfolgte mittels einer *T4 Polynucleotide Kinase* gemäß des vom Hersteller empfohlenen Protokolls. Eine Dephosphorylierung am 3'- und 5'-Ende von DNS-Fragmenten erfolgte mithilfe einer *Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP)* nach vom Hersteller empfohlenem Protokoll. Bei Bedarf wurde die Enzymaktivität nach erfolgter Reaktion durch Hitzeinaktivierung mittels vom Hersteller empfohlener Temperatur unterbunden sowie die Probe mithilfe eines *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* der Firma Promega nach vom Hersteller empfohlenem Protokoll gereinigt.

##### **4.7.3. Ligation von DNS-Fragmenten**

Eine Ligation von DNS-Fragmenten erfolgte unter Verwendung einer *T4 DNA Ligase* nach vom Hersteller empfohlenem Protokoll. Bei einer sogenannten *sticky-end-Ligation* werden zwei DNS-Fragmente mit komplementärem Basenüberhang an einem Einzelstrang ligiert. Bei einer *blunt-end-Ligation* enden die DNS-Fragmente ohne Basenüberhang. In der vorliegenden Arbeit wurden für



eine *sticky-end*-Ligation die Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII und KpnI verwendet. Für eine *blunt-end*-Ligation dienten die Schnittstellen der Restriktionsenzyme PmeI und EcoRV. Nach erfolgter Ligation wurde die Probe mithilfe einer Gelelektrophorese auf die vollständig abgelaufene Ligationsreaktion hin kontrolliert.

#### 4.8. Mutation von Plasmid-DNS

Substitutionen und Deletionen von Basenpaaren sowie der Austausch einer Resistenzkassette in Plasmid-DNS wurden mithilfe eines *Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma New England BioLabs nach dem empfohlenen Protokoll durchgeführt. Die hierfür benötigten Oligonukleotide wurden mithilfe des Onlinetools *NEBaseChanger™* (<https://nebasechanger.neb.com/>) derselben Firma erstellt und bei der Firma Metabion bestellt.

#### 4.9. Chemische Transformation von *E. coli*

Unter einer Transformation versteht man die Übertragung von Genen mittels freier DNS. Zellen, die in der Lage sind, freie DNS aufzunehmen, werden als kompetent bezeichnet. Die in dieser Arbeit angewandte Methode, welche zu kompetenten *E. coli*-Zellen führt, wird nachfolgend beschrieben.

##### 4.9.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der sogenannten Rubidiumchlorid-Methode, einer Variante der Calciumchlorid-Methode (COHEN *et al.*, 1972).

K-Acetat pH 5,8	0,30 g (Endkonzentration: 30 mM)
RbCl <sub>2</sub>	1,21 g (Endkonzentration: 100 mM)
CaCl <sub>2</sub>	0,15 g (Endkonzentration: 10 mM)
MnCl <sub>2</sub>	1 g (Endkonzentration: 50 mM)
Glycerin	15 ml [15% (v/v)]
ddH <sub>2</sub> O	85 ml

**Tabelle 16: Inhaltsstoffe des Transformationspuffers I**

Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt.

MOPS pH 7	0,12 g (Endkonzentration: 10 mM)
RbCl <sub>2</sub>	0,06 g (Endkonzentration: 10 mM)
CaCl <sub>2</sub>	0,55 g (Endkonzentration: 75 mM)
Glycerin	7,5 ml [15% (v/v)]
ddH <sub>2</sub> O	42,5 ml

**Tabelle 17: Inhaltsstoffe des Transformationspuffers II**

Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt.

Zunächst wurden 23,75 ml LB-Flüssigmedium (siehe Abschnitt 2.1.1.) mit 1,25 ml einer *E. coli*-über Nacht-Kultur beimpft und bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator bei 140 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,56-0,6 inkubiert. Die Flüssigkultur wurde nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml Transformationspuffer I resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit auf Eis für 5 min sowie eine anschließende Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 2 ml Transformationspuffer II resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut für 15 min auf Eis inkubiert und im Anschluss in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

#### 4.9.2. Chemische Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die chemische Transformation erfolgte in abgewandelter Form nach der Methode von Hanahan (1983). Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide beinhalteten eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion der Transformationsklone.

Zunächst wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µl des zu transformierenden Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 4.7.3.) steril zugegeben. Für die Transformation von Plasmid-DNS wurde lediglich 1 µl der DNS-Lösung eingesetzt. Nach einer Inkubation der Zellen auf Eis für 30 min folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Nach einer anschließenden zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Flüssigmedium (siehe Abschnitt 2.1.1.) zugegeben und die Zellen für weitere 60 min bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 400 rpm inkubiert. Hiernach wurden 100 µl der Bakterienlösung auf einer LB-Agarplatte mit dem Selektionsmarker Ampicillin (siehe Tabelle 2.14) ausplattiert. Die verbliebenen 900 µl Lösung wurden bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 100 µl LB-Flüssigmedium

resuspendiert und auf einer weiteren LB-Platte mit dem Selektionsmarker Ampicillin ausplattiert.

#### 4.10. Deletion einer Hygromycin-Resistenzkassette

Die *Anika* Mutante von *A. nidulans* wurde durch die Deletion des *nikA*-Gens unter Einsatz eines  $\beta$ -*rec/six*-Systems (HARTMANN *et al.*, 2010) hergestellt. Dies bedeutet, dass für die Expression der Hygromycin-Deletionskassette der Mutante ein sogenannter *xylP*-Promoter gewählt wurde, welcher unter normalen Wachstumsbedingungen in Gegenwart von Glucose die Resistenzkassette exprimiert. Enthält das Nährmedium jedoch die Kohlenhydratquelle Xylose, so aktiviert der *xylP*-Promoter die Transkription eines ihm nachgeschalteten  $\beta$ -*rec*-Gens, codierend für eine  $\beta$ -Rekombinase. Daraufhin wird durch  $\beta$ -Rekombination die auf das  $\beta$ -*rec*-Gen folgende Hygromycin-Resistenzkassette deletiert. Durch die Anzucht der *Anika* Mutante auf AMM-Agar mit Xylose (siehe Tabelle 2.9) erfolgte demnach die Deletion der Hygromycin-Resistenzkassette aus dem Stamm, wodurch dieser erneut für Transformationen mit Hygromycin-Selektion zur Verfügung stand.

#### 4.11. Transformation von *A. fumigatus* und *A. nidulans*

Die Protoplastentransformation von *A. fumigatus* und *A. nidulans* erfolgte nach einem von Prof. Sven Krappmann (persönliche Mitteilung) modifizierten Protokoll (YELTON *et al.*, 1984). Bei einer Transformation von *A. fumigatus* wurden Plasmide beziehungsweise lineare DNS-Konstrukte mit Hygromycin- oder Pyrithiamin-Resistenzkassette eingesetzt, bei *A. nidulans* ausschließlich Plasmide mit Hygromycin-Resistenzkassette. Zur Selektion der Transformationsklone wurde dem Anzuchtmedium der entsprechende Selektionsmarker zugesetzt.

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	59,6 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lsg (0,2 M)	7,2 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lsg (0,2 M)	2,8 ml

**Tabelle 18: Inhaltsstoffe der Lösung I**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 200 ml gelöst. Der pH-Wert wurde auf 5,5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Sorbitol	91,1 g
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5)	5 ml

**Tabelle 19: Inhaltsstoffe der Lösung II**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 500 ml gelöst und bei 4 °C gelagert.

Sorbitol	18,22 g
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (1 M)	1 ml

**Tabelle 20: Inhaltsstoffe der Lösung III**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 100 ml gelöst und bei 4 °C gelagert.

Polyethylenglycol 4000	60 g
TRIS-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (1 M)	1 ml

**Tabelle 21: Inhaltsstoffe der Lösung IV**

Die Inhaltsstoffe wurden in demineralisiertem Wasser mit einem Endvolumen von 100 ml gelöst und bei Raumtemperatur vor Lichteinfall geschützt gelagert.

Zur Anzucht der Transformationsklone wurden pro Transformationsansatz zwei Agarplatten mit je 25 ml Sorbitol-Agar und jeweiligem Selektionsmarker angefertigt.

Es wurden 200 ml AMM-Flüssigmedium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane mit ca.  $2 \times 10^8$  Sporen beimpft und in einem Schüttelinkubator für etwa 16 h bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Die Ernte des Myzels erfolgte durch eine Filtration über einen Bottle-Top-Filter (0,45 µm Porendurchmesser), wonach das Myzel mit demineralisiertem Wasser gewaschen sowie mit einem sterilen Spatel abgetragen und in einen 50 ml-Erlenmeyerkolben überführt wurde. Dort erfolgte eine Resuspendierung in einer frisch hergestellten und durch einen Spritzenaufsatzfilter (0,45 µm Porendurchmesser) steril filtrierten Lösung bestehend aus 0,2 g *Lysing Enzyme* von *Trichoderma harzianum* in 10 ml Lösung I. Zur Protoplastierung wurde der Erlenmeyerkolben für ca. 45-60 min in einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Die Protoplastierung wurde nach 45 min Inkubation mikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls fortgesetzt. Zur Befreiung der Protoplasten von Myzelrückständen wurde die Flüssigkeit durch

einen Miracloth-Filter in ein 50 ml Reaktionsgefäß filtriert, auf Eis gekühlt und mit 20 ml kalter Lösung II versetzt. Es folgte eine Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 4 °C und 5100 rpm für 15 min. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Abpipettieren verworfen und die Protoplasten schonend in 1 ml Lösung II resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C und 5100 rpm für 5 min. Der Überstand wurde erneut durch vorsichtiges Abpipettieren verworfen und das Sediment in 400 µl Lösung III resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Protoplasten-Anzahl in 10 µl Lösung ausgezählt und die Protoplasten-Konzentration durch Zugabe von Lösung III auf ca.  $1 \times 10^8$ /ml eingestellt. Nun wurden 100 µl dieser Lösung in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl Lösung IV und bis zu 30 µl DNS-Lösung versetzt, wobei 3-5 µg DNS bei Plasmidtransformation sowie 10 µg DNS bei Transformation linearer DNS-Konstrukte eingesetzt wurden. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit weiteren 2 ml der Lösung IV versetzt, schonend vermischt und für 35 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Protoplastensuspension wurde abschließend mit 10 ml Sorbitol-Softagar versetzt, welcher nach Schmelzen des Agars in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 52 °C flüssig gehalten wurde. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Protoplastensuspension durchmischt und auf zwei Sorbitol-Agarplatten mit jeweiligem Selektionsmarker verteilt. Die Platten wurden für ca. 3 d bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden per steriler Öse Sporen gewachsener Kolonien auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker überführt und dort mittels 3-Ösenausstrich in Einzelkolonien aufgetrennt. Die Auftrennung in Einzelkolonien erfolgte aufgrund der Tatsache, dass Transformationskolonien aus einzelnen Protoplasten entstehen, welche ihrerseits jedoch nicht einen einzelnen, sondern mehrere Zellkerne beinhalten. Um den neu gewonnen Stamm rein vorliegen zu haben, erfolgte eine Auftrennung in Einzelkolonien, welche aus einzelnen Sporen mit je nur einem Zellkern entstehen.

#### **4.12. Sequenzanalysen und Datenbanken**

Sequenzierungen von DNS-Fragmenten erfolgten über den *GATC* Service der Firma Eurofins Genomics. Die Analyse der Sequenzierungsdaten sowie die Erstellung schematischer Darstellungen von Plasmid-DNS erfolgte mithilfe der Programme *SeqBuilder Pro* der Firma DNASTAR und *Chromas* (Version 2.6.5)

der Firma Technelysium. Schematische Darstellungen sowie Vorhersagen über spezifische Domänen eines Proteins wurden über das *SMART*-Onlinetool des European Molecular Biology Laboratory (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) generiert. Sequenz-Alignements wurden mithilfe des Onlinetools *Multiple Sequence Alignment - Clustal Omega* des European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) sowie dem *Standard Protein BLAST* des National Center for Biotechnology Information ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BLASTSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome)) erstellt. Vorhersagen über putative *nuclear localization sequences* (NLS) in einer Aminosäuresequenz erfolgten mithilfe des Online-Programms NucPred des *Stockholm Bioinformatics Center* (<https://nucpred.bioinfo.se/nucpred/>) sowie des Online-Programms cNLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_help.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_help.cgi)). Vorhersagen über *nuclear export signals* (NES) erfolgten über das Online-Programm NetNES 1.1 der *Technical University of Denmark* (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5D7E2C9A00004E3F5D666930&wait=20>).

Die Benennung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine sowie der ihnen zugehörigen Gene basiert auf der Nomenklatur der *Aspergillus Genome Database* (AspGD) (<http://www.aspgd.org/>).

## 5. Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopische Untersuchung von Präparaten erfolgte am konfokalen Mikroskop LSM 880 der Firma Carl Zeiss (Jena). Die Verarbeitung der Bilder erfolgte über die ZEN Mikroskopie- und Imaging-Software der Firma Carl Zeiss (Jena) sowie über das Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop.

### 5.1. Mikroskopie fixierter Präparate

#### 5.1.1. Fixierung mikroskopischer Präparate

Zur Fixierung wurden in einer 24-Well-Platte auf sterilen Glasplättchen gewachsene Pilzhypen für 5 min mit 3,7 % Formaldehyd in PBS (0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 g NaCl; ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.; pH 7,4; sterilfiltriert) versetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden das Präparat je nach Bedarf verwendet.

### **5.1.2. Mikroskopische Untersuchung fixierter Präparate**

Nach Fixierung des Präparates wurde dieses auf einem Objektträger in einen Tropfen *VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium* der Firma Vector Laboratories getaucht, wobei bei Bedarf das *Mounting Medium* mit dem Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Zellkernfärbung verwendet wurde. Das Präparat wurde mit Nagellack luftdicht versiegelt.

### **5.2. Mikroskopie vitaler Präparate**

Die Mikroskopie vitaler Pilzhypen fand entweder mit auf runden Deckgläschen gewachsenen Hyphen statt, wobei das Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen PBS verbracht wurde, oder mit in flüssigem Nährmedium gewachsenen Hyphen in einer *Life Cell Imaging*-Kammer der Firma Ibidi (15 µl-Slide 8 Well). Die Mikroskopie fand bei Raumtemperatur oder mittels einer beheizten Kammer bei 37 °C statt. Das Nährmedium wurde bei Bedarf mit einem Stressor versetzt (siehe Abschnitt 3.2., Tabelle 15) und die Anpassungsreaktion der Hyphen analysiert.

## IV. ERGEBNISSE

Untersuchungsergebnisse von Dr. Anja Spadinger erbrachten Hinweise darauf, dass sich das Protein TcsC im Zellkern einer Hyphe befindet und nicht, wie zuvor angenommen, in deren Zytoplasma. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien erfolgten hauptsächlich im Hinblick auf diese unerwartete Lokalisation des Proteins TcsC in *A. fumigatus*. Sie dienten dabei unter anderem der Untersuchung der funktionellen Bedeutung und Lokalisation von TcsC unter dem Einfluss diverser Stressoren. Zur Darstellung seiner Lokalisation wurde TcsC mit dem grün autofluoreszierenden Protein GFP fusioniert und die Lokalisation des Fusionsproteins in einer Hyphe fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Bisherige Arbeiten ergaben keinen Hinweis darauf, dass die Expression eines GFP-TcsC-Fusionsproteins Auswirkungen auf das native TcsC-Molekül eines Pilzes hat. Es wurde allerdings zu einem späten Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit ein negativer Einfluss eines GFP-TcsC-Fusionsproteins auf die Anpassungsfähigkeit des exprimierenden Organismus an hyperosmolaren Stress erkannt. Bei vielen Untersuchungen wurde neben TcsC auch vergleichend mit dem zu TcsC homologen Protein NikA in *A. nidulans* gearbeitet. Aufgrund einer natürlichen Resistenz der Pilzspezies gegenüber Pyrithiamin erwiesen sich die Arbeiten mit *A. nidulans* als schwierig, da hier die bei *A. fumigatus* eingesetzten Konstrukte mit Pyrithiamin als Resistenzmarker nicht verwendet werden konnten. Dieses Problem konnte jedoch durch die Ausarbeitung einer alternativen Herangehensweise behoben werden. Um die für die Lokalisation von TcsC und NikA in den Zellkernen einer Hyphe verantwortlichen Proteinabschnitte näher zu charakterisieren, wurden die Gensequenzen von *tcsC* und *nikA* durch Deletionen sowie Substitutionen von Aminosäuren manipuliert. Bei beiden Genen fand durch diese Manipulationen eine Annäherung an deren sogenannte *nuclear localization sequence* (NLS) statt, eine für die Zellkernlokalisation codierende Gensequenz. Es wurde zusätzlich untersucht, inwieweit sich Manipulationen der NLS auf die Aktivität des Proteins auswirken. Die vorliegende Arbeit umfasste außerdem die weitere Ausarbeitung eines von Prof. Frank Ebel und Dr. Anja Spadinger entwickelten *Screening Assays* für antifungale Wirkstoffe. Zudem fanden Untersuchungen an den Proteinen Af-Cbf5 und NimA statt. Af-Cbf5 ist wie TcsC im Zellkern einer Hyphe lokalisiert und wurde vergleichend mit TcsC



in *A. fumigatus* studiert. NimA ist eine Kinase, die als homologes Protein sowohl in *A. fumigatus* als auch in *A. nidulans* vorkommt. Sie ist an der Regulation der Mitose beteiligt und in der Interphase an den Septen einer Hyphe lokalisiert. Im Zuge dieser Arbeit wurde NimA in Bezug auf seine Lokalisation hin näher charakterisiert.

Für die Expression eines zu untersuchenden Proteins in *A. fumigatus* und *A. nidulans* wurde als Vektor ein Plasmidkonstrukt erstellt, welches die Gensequenz des jeweiligen Proteins beinhaltet. Je nach Untersuchungsziel wurde die Proteinsequenz mit der Sequenz eines autofluoreszierenden Proteins (GFP oder RFP) fusioniert. Die im Zuge der vorliegenden Arbeit hergestellten Konstrukte sind im Anhang in den Tabellen A 6 und A 7 aufgelistet, die für die Amplifizierung der Gensequenzen verwendeten Oligonukleotide im Anhang in den Tabellen A 4 und A 5. Nicht eigenständig hergestellte Plasmidkonstrukte wurden von unterschiedlichen Quellen bezogen und sind samt der jeweils zugehörigen Quelle im Anhang in Tabelle A 3 aufgeführt.

## 1. TcsC-/NikA-Studie

### 1.1. Besondere Anforderungen an Plasmide bei Arbeiten mit *A. nidulans*

In dieser Arbeit wurde neben der Gruppe III-HHK TcsC aus *A. fumigatus* vergleichend auch das homologe Protein NikA aus *A. nidulans* untersucht. Abbildung 13 zeigt eine schematische Darstellung des Proteins NikA.



**Abbildung 13: Die Gruppe III-HHK NikA aus *A. nidulans* (NikA<sub>1-1297</sub>)**

HAMP:	HAMP-Domäne
HisKA:	Histidin-Kinase A-Subdomäne
HATPase_c:	Histidin-Kinase-ähnliche ATPase-Subdomäne
REC:	receiver-Domäne
pink:	low complexity region

Für die Expression von GFP- und RFP-Fusionsproteinen wurden in *A. fumigatus* entsprechende Derivate des Plasmids pSK379 (siehe Anhang Abbildung A 2) eingesetzt. pSK379 trägt eine Pyrithiamin-Resistenzkassette, die in *A. fumigatus* als Selektionsmarker eingesetzt wird. Da im Verlauf dieser Arbeit sehr schnell klar

wurde, dass *A. nidulans* eine natürliche Pyrithiamin-Resistenz besitzt, wurden für diese Spezies mehrere alternative Ansätze getestet, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

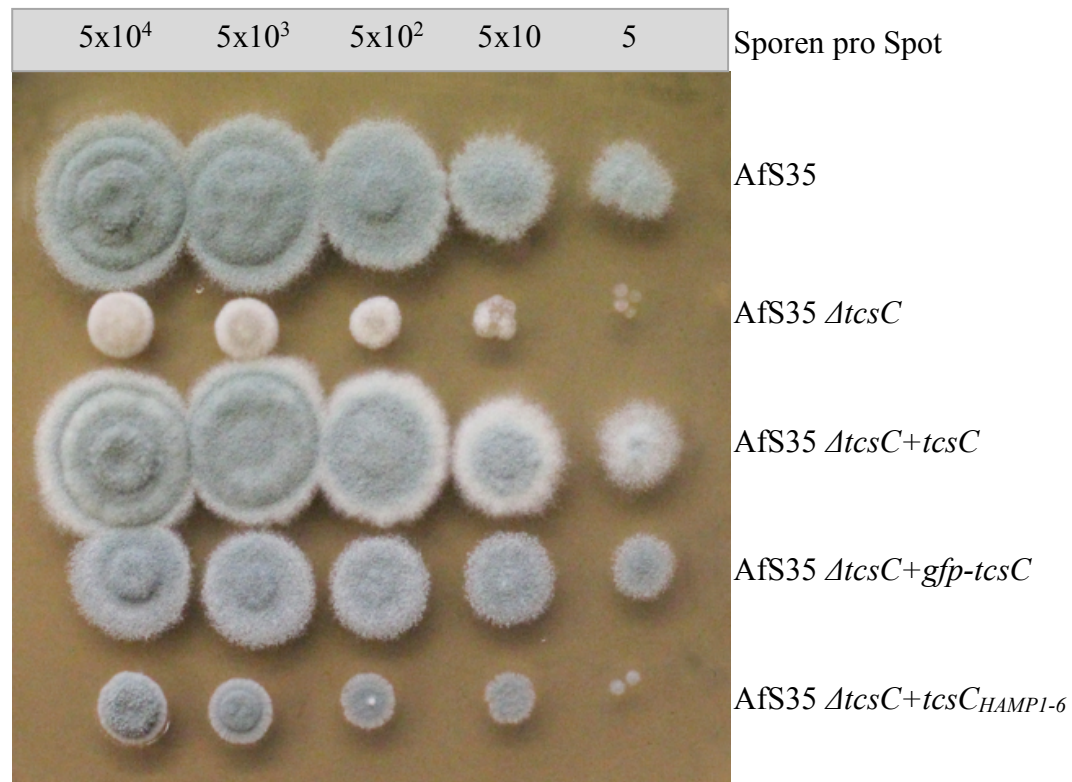
Zu Beginn wurde das Plasmid pSilent (siehe Anhang Abbildung A 4) als Alternative für Arbeiten an *A. nidulans* in Betracht gezogen. Dieses Plasmid trägt im Gegensatz zu pSK379 eine Hygromycin-Resistenzkassette. Zum Test der Funktionalität als Transformationsvektor wurden *gfp* und *rfp* in das Plasmid integriert. Hierfür wurde pSilent mit den Restriktionsenzymen HindIII und KpnI geschnitten, wobei ein 194 Basenpaare langes Fragment des Plasmids entfernt wurde. Die *gfp*- bzw. *rfp*-Gensequenz wurde per PCR aus pSK379-*gfp* bzw. -*rfp* amplifiziert, wobei die verwendeten Oligonukleotide jeweils am 5' Ende eine HindIII- und am 3' Ende eine KpnI-Schnittstelle beinhalteten. Nach enzymatischer Behandlung mit den genannten Restriktionsenzymen wurde das PCR-Produkt in den geschnittenen Vektor per *sticky-end*-Ligation integriert. Der in pSilent enthaltene *trpC*-Promoter ergab jedoch in *A. nidulans* eine zu schwache Expression von GFP und RFP, weshalb pSilent-*gfp* und pSilent-*rfp* für keine weiteren Versuche verwendet wurden. Erfolgreich war dagegen eine Ko-Transformation der Plasmide pSK379 und pSilent. pSK379 diente dabei als Vektor der gewünschten Gensequenzen, welche dank des im Plasmid enthaltenen *gpdA*-Promoters in hoher Zahl exprimiert wurden. pSilent sorgte für eine Hygromycin-Resistenz bei den Transformationsklonen, die beide Plasmide aufgenommen hatten. Dieses Verfahren wurde routinemäßig bei Arbeiten mit *A. nidulans* angewendet. Ein Nachteil hierbei war, dass der Selektionsdruck nur über pSilent und nicht über pSK379 aufgebaut werden konnte und entstandene Pilzstämme die über pSK379 vermittelte Geninformation potentiell wieder verlieren konnten. Aufgrund dessen wurden die Arbeiten an *A. nidulans* final durch einen Umbau des Vektors pSK379 optimiert. Die Pyrithiamin-Resistenzkassette des Plasmids wurde dabei durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt, wodurch eine Ko-Transformation mit pSilent nicht mehr nötig war. pSK379 wurde hierfür mittels PCR ohne Pyrithiamin-Resistenzkassette amplifiziert (für Erläuterungen zur Mutations-PCR, siehe Material und Methoden, Abschnitt 4.8.) und die lineare Plasmid-DNS im Anschluss mit einer aus pSilent per PCR amplifizierten Hygromycin-Resistenzkassette ligiert. Zur Insertion weiterer Gensequenzen in das resultierende Plasmid pSK379-*hygromycin* (siehe Anhang Abbildung A 5) diente die Schnittstelle des

Restriktionsenzym *PmeI*. Die jeweiligen DNS-Abschnitte wurden in den geschnittenen Vektor per *blunt-end*-Ligation integriert.

## 1.2. Untersuchungen einer *AtcsC* Mutante und deren Komplementationen in hyperosmolarem Milieu

Der *A. fumigatus*-Stamm AfS35 kann sich dank seines HOG-Signalwegs gut an hyperosmolare Bedingungen anpassen. Dies zeigte sich in einem Tüpfeltest auf mit Sorbitol versetztem Nähragar anhand großflächiger Kolonien. Der Pilz bildete Lufthyphen aus und sporulierte stark. Deletiert man in AfS35 jedoch das *tcsC*-Gen, so ist der Stamm nicht mehr in der Lage, sich auf hyperosmolaren Stress einzustellen. Dies stellte sich beim Tüpfeltest durch einen schwachen Wuchs dar. Die Kolonien waren klein, kompakt und bildeten keine Lufthyphen aus. Es fand zudem keine Sporulation statt. Komplementiert man die *AtcsC* Mutante mit *tcsC*, so führt dies zur Wiederherstellung der Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress. Das Koloniewachstum des Stammes AfS35 *AtcsC+tcsC* glich im Tüpfeltest dem von AfS35. Die Kolonien waren breitflächig, bildeten Lufthyphen aus und sporulierten deutlich. Eine Komplementation der *AtcsC* Mutante mit dem Fusionsprotein GFP-TcsC führte zu einer Wiederherstellung der Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress, wobei jedoch ein gewisser Unterschied zum Wildstamm zu beobachten war. Die Kolonien des Stammes AfS35 *AtcsC+gfp-tcsC* waren im Vergleich zu AfS35 etwas kleiner und kompakter. Die Sporulation war vergleichbar, es wurden ebenfalls Lufthyphen gebildet. Auf die beobachtete Abweichung in der Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress wird in einem späteren Abschnitt der vorliegenden Arbeit näher eingegangen (siehe Abschnitt 1.5.). Ein Fusionsprotein bestehend aus GFP sowie einem um seine N-terminalen Aminosäuren verkürzten TcsC-Molekül (*TcsC<sub>HAMP1-6</sub>*) zeigt unter hyperosmolarem Stress eine deutlich geringere Aktivität als das Fusionsprotein GFP-TcsC. Die Kolonien des Stammes AfS35 *AtcsC+tcsC<sub>HAMP1-6</sub>* wuchsen unter Sorbitol-Stress nur gering und kompakt, bei der letzten Verdünnungsstufe konnten zudem von rechnerisch fünf Sporen lediglich zwei Kolonien bilden. Diese Mutante ähnelte im Wachstum der *AtcsC* Mutante, zeigte aber eine deutlich stärkere Sporulation. Die geringe Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress ist dahingehend eine interessante Erkenntnis, als dass die Expression des Fusionsproteins GFP-TcsC<sub>HAMP1-6</sub> die Sensibilität einer *AtcsC* Mutante gegenüber Fludioxonil wiederherzustellen vermag (SPADINGER & EBEL, 2017).

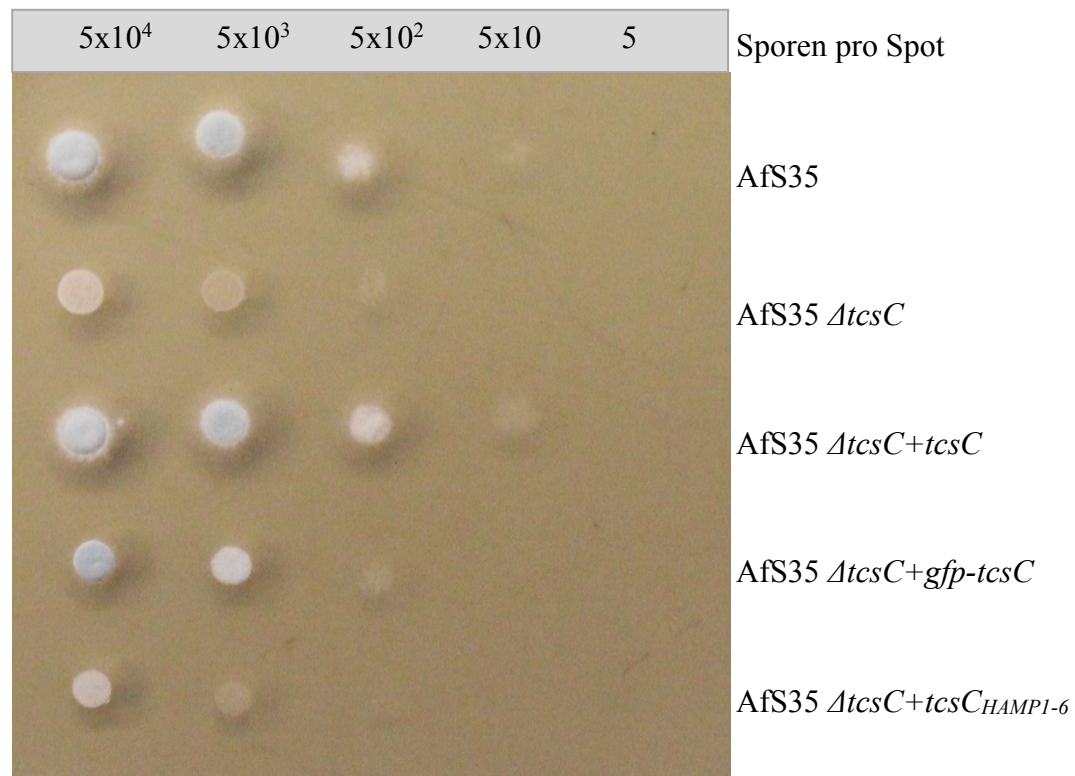
Abbildung 14 stellt die erläuterten Ergebnisse anhand eines Tüpfeltests auf AMM-Agar versetzt mit 1,2 M Sorbitol sowie in 98 % unvergälltem Ethanol gelöstem Doxycyclin (Endkonzentration 100 µg/ml) dar. Doxycyclin wurde dem Nähragar zugesetzt, da der Stamm AfS35  $\Delta tcsC+tcsC_{HAMP1-6}$  nur so das verkürzte Protein Tcs<sub>HAMP1-6</sub> bildete. Die Gensequenz von *tcsC<sub>HAMP1-6</sub>* war Teil des integrierten Plasmids pSS015 (siehe Anhang Abbildung A 7) und stand unter der Kontrolle eines *tet-on*-Promoters, der durch Doxycyclin aktiviert wird. Somit würde sich der Stamm AfS35  $\Delta tcsC+tcsC_{HAMP1-6}$  ohne Doxycyclin-Zusatz im Nähragar wie eine  $\Delta tcsC$  Mutante verhalten. Doxycyclin übte keinen Einfluss auf das Koloniewachstum der Stämme AfS35, AfS35  $\Delta tcsC$ , AfS35  $\Delta tcsC+tcsC$  und AfS35  $\Delta tcsC+gfp-tcsC$  aus (siehe Anhang Abbildung A 8).



**Abbildung 14: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol und 100 µg/ml Doxycyclin**

Die verwendeten Stämme wiesen bei einem Tüpfeltest auf mit 1 M Natriumchlorid versetztem AMM-Agar insgesamt ein deutlich vermindertes Wachstum auf. Es waren jedoch auch bei diesem Test die Stämme AfS35 und AfS35  $\Delta tcsC+tcsC$  in ihrer Koloniemorphologie vergleichbar. Diese Kolonien bildeten keine Lufthyphen aus, aber sie sporulierten. Ab der Verdünnungsstufe von 5x10 Sporen pro Tüpfelspot traten keine Kolonien mehr hervor. Die  $\Delta tcsC$  Mutante und der Stamm AfS35  $\Delta tcsC+tcsC_{HAMP1-6}$  wiesen jeweils ein sehr schwaches Wachstum ohne

Sporulation auf. Es fand bei beiden ab der Verdünnungsstufe von  $5 \times 10^2$  Sporen pro Spot keine Koloniebildung mehr statt. Dies galt auch für den Stamm AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC$ , wobei hier jedoch die Kolonien der Verdünnungsstufen  $5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^3$  größer waren, als bei AfS35  $\Delta tcsC$  und AfS35  $\Delta tcsC + tcsC_{HAMP1-6}$ . Die Kolonie der ersten Verdünnungsstufe zeigte Sporulation. Die erläuterten Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1 M Natriumchlorid und 100 µg/ml Doxycyclin**

### 1.3. Lokalisation von TcsC und NikA in *A. fumigatus* bzw. *A. nidulans*

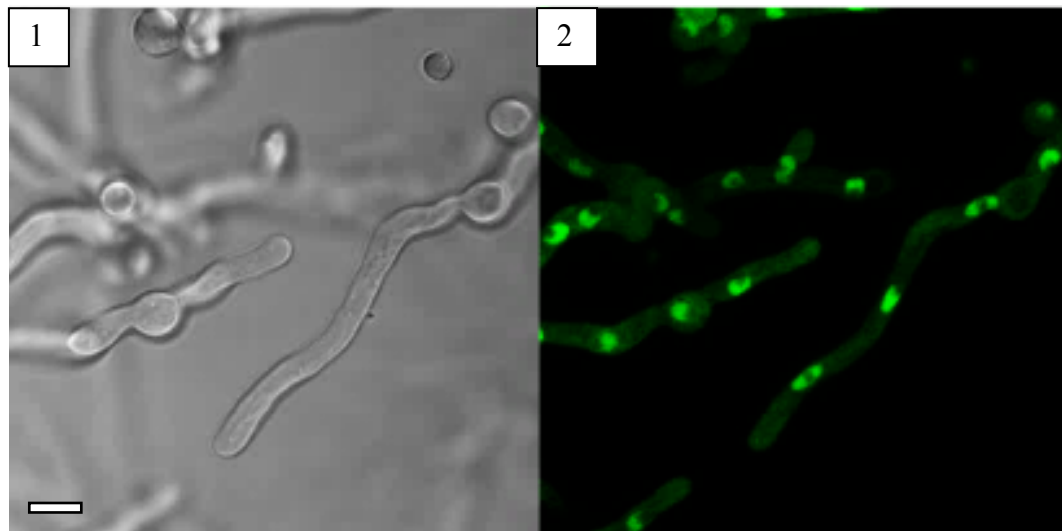
Vorergebnisse von Dr. Anja Spadinger deuteten darauf hin, dass sich TcsC in AfS35 wider Erwarten im inaktiven Zustand im Zellkern befindet und erst eine Aktivierung des Proteins zu dessen Translokation in das Zytoplasma führt. Um diese Beobachtungen zu reproduzieren und die Lokalisation genauer zu untersuchen, wurde in AfS35 das Fusionsprotein GFP-TcsC exprimiert und der Stamm fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die in den folgenden Abschnitten erläuterten Abbildungen wurden mit einem konfokalen Mikroskop LSM 880 der Firma Carl Zeiss (Jena) aufgenommen und zeigen entweder einzelne optische Ebenen (*Single Plane*) oder eine Überlagerung mehrerer optischer Ebenen (*Maximum Intensity Projection*). Die Überlagerung mehrerer Fluoreszenzsignale

wurde als *Overlay* bezeichnet, eine Aufnahme ohne Fluoreszenzsignale als *BrightField*.

### 1.3.1. Die Zellkernlokalisation von TcsC tritt bei N- und C-terminaler Fusion mit GFP auf

Der Stamm AfS35 *gfp-tcsC* wies eine distinkte Fluoreszenzmarkierung auf, die den Zellkernen der Hyphe ähnelte (siehe Abbildung 16). In dem hier exprimierten Fusionsprotein GFP-TcsC befand sich GFP am N-Terminus von TcsC. Die genetische Information für das Fusionsprotein wurde über den Vektor pSK379-*gfp* vermittelt (siehe Anhang Abbildung A 3). Hierfür wurde die Gensequenz von *tcsC* per PCR aus DNS des Stammes AfS35 amplifiziert und anschließend über die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pSK379-*gfp* am 5'-Ende mit *gfp* fusioniert. Da die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym EcoRV am 3'-Ende der *gfp*-Sequenz nicht exakt in das Leseraster fällt, musste zur Vermeidung eines *frameshifts* vor die *tcsC*-Sequenz eine zusätzliche Base eingefügt werden. Hierfür wurde über das für die Amplifikation von *tcsC* verwendete Oligonukleotid vor dem Startcodon von *tcsC* am 5'-Ende die Base Guanin (G) eingefügt. Zusammen mit den beiden Basen Adenin (A) und Thymin (T) der halben EcoRV-Schnittstelle entstand dabei das Basentriplett ATG, codierend für die Aminosäure Methionin (M).

Bevor die Zellkernlokalisation durch weitere Maßnahmen verifiziert würde, sollte vorerst untersucht werden, ob die Lage von GFP im Fusionsprotein Auswirkungen auf die Lokalisation des Fusionsproteins in der Hyphe hat. Hierfür wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem sich GFP am C-terminalen Ende des Fusionsproteins befand, demnach nicht vor, sondern hinter dem TcsC-Molekül. Eine Expression des Fusionsproteins TcsC-GFP in AfS35 führte ebenfalls zu der bei GFP-TcsC beobachteten Lokalisation der Fluoreszenzmarkierung (siehe Abbildung 17).



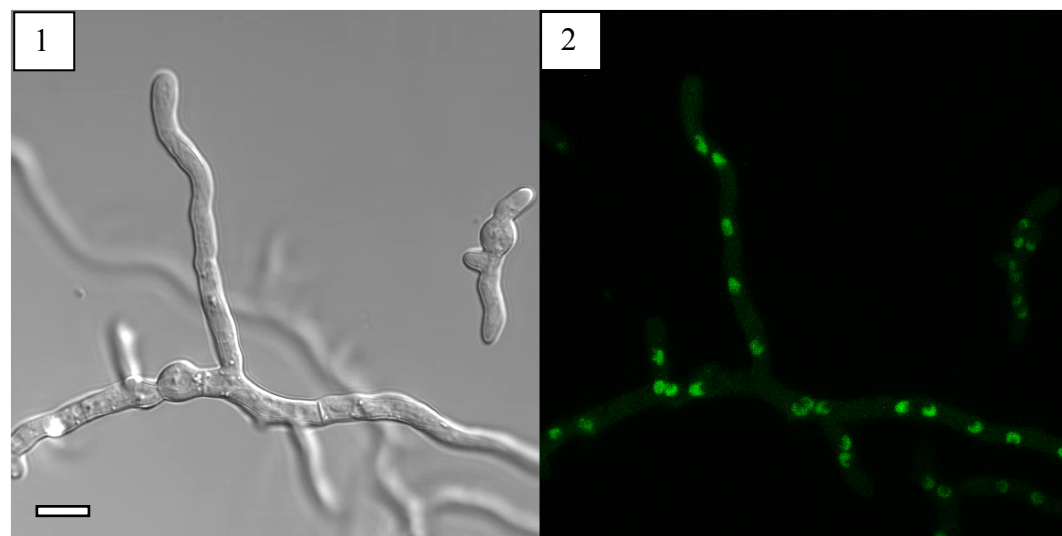
**Abbildung 16: AfS35 *gfp-tcsC***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



**Abbildung 17: AfS35 *tcsC-gfp***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

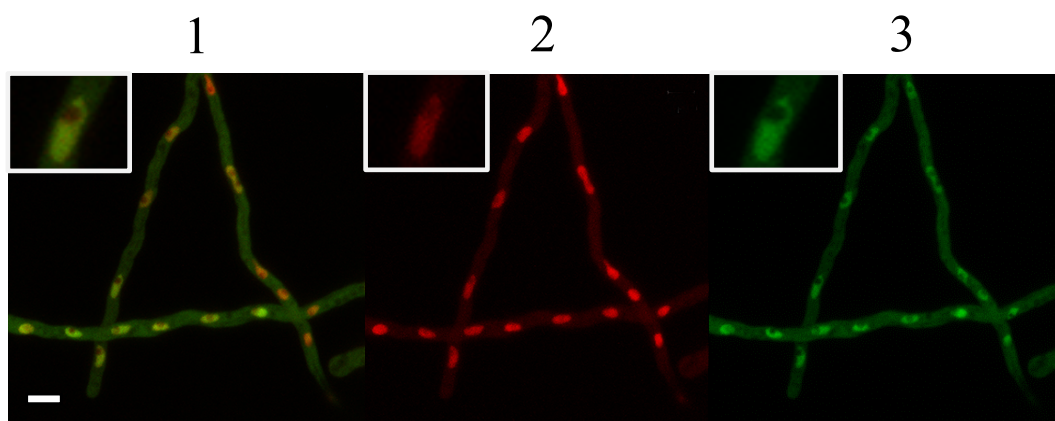
2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

### 1.3.2. TcsC ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein

Um herauszufinden, ob die distinkte Lokalisation des GFP-TcsC-Fusionsproteins tatsächlich den Zellkern darstellt, wurde der Stamm AfS35 *gfp-tcsC* per Transformation mit einem weiteren, im Zellkern lokalisierten Fusionsprotein



ausgestattet. Dieses bestand aus dem rot fluoreszierenden Protein RFP sowie den 156 C-terminalen Aminosäuren von StuA (Afu2g07900) aus AfS35. StuA ist ein Protein, welches in *A. nidulans* für die Differenzierung und räumliche Organisation der Konidiophoren verantwortlich ist (MILLER *et al.*, 1992). Die 156 C-terminalen Aminosäuren von StuA ergeben eine putative Zellkernlokalisationsdomäne, womit das Fusionsprotein RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> eine eindeutige Zellkernmarkierung erzeugt (SUELMANN *et al.*, 1997). Die Lokalisation von RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> ändert sich zudem in der Interphase einer Zelle weder unter hyperosmolaren Bedingungen noch unter Fludioxonil-Einfluss. Somit stellte das Fusionsprotein RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> einen verlässlichen Zellkernmarker für die folgend beschriebenen Studien dar. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen des Stammes AfS35 *gfp-tcsC* + *rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub>* konnte bewiesen werden, dass die distinkte Lokalisation des Fusionsproteins GFP-TcsC tatsächlich dem Zellkern entspricht. Die rote Fluoreszenzmarkierung durch RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> entsprach stets der grünen Fluoreszenzmarkierung durch GFP-TcsC (siehe Abbildung 18). Das Fluoreszenzsignal von GFP-TcsC zeigte in der *Maximum Intensity Projection* eine für den Nucleolus typische Aussparung im Zellkern. Diese Aussparung war bei der Fluoreszenzmarkierung durch RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> nicht nachvollziehbar. Die zur dargestellten Studie zugehörige *Bright Field (Single Plane)*-Aufnahme ist im Anhang in Abbildung A 9 zu finden.



**Abbildung 18:** AfS35 *gfp-tcsC* + *rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub>*

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

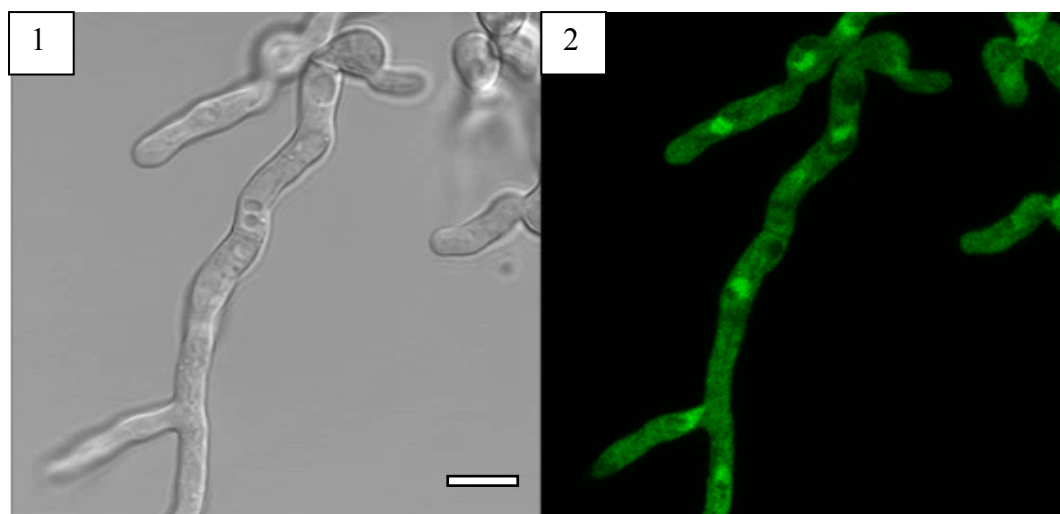
Maßstab: 5 µm

- 1: Overlay (*Maximum Intensity Projection*)
- 2: RFP (*Maximum Intensity Projection*)
- 3: GFP (*Maximum Intensity Projection*)

Somit stand fest, dass das Fusionsprotein GFP-TcsC in AfS35 im Zellkern



lokalisiert ist. Der Pilz exprimiert allerdings neben GFP-TcsC zusätzlich noch sein natives TcsC-Molekül. Deshalb stellte sich die Frage, ob das Vorhandensein des nativen TcsC einen Einfluss auf die Lokalisation von GFP-TcsC ausübte. Da sich eine *ΔtcsC* Mutante nur schwer transformieren lässt, wurde dem Stamm AfS35 *gfp-tcsC* durch die Transformation eines von McCormick *et al.* (2012) publizierten *tcsC*-Deletionskonstruktes die Fähigkeit zur Expression seines nativen TcsC-Proteins genommen. Das verwendete *tcsC*-Deletionskonstrukt ist im Anhang in Abbildung A 6 schematisch dargestellt. Es stellte sich heraus, dass das Fusionsprotein GFP-TcsC in der *ΔtcsC* Mutante genau wie in AfS35 im Zellkern lokalisiert war (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

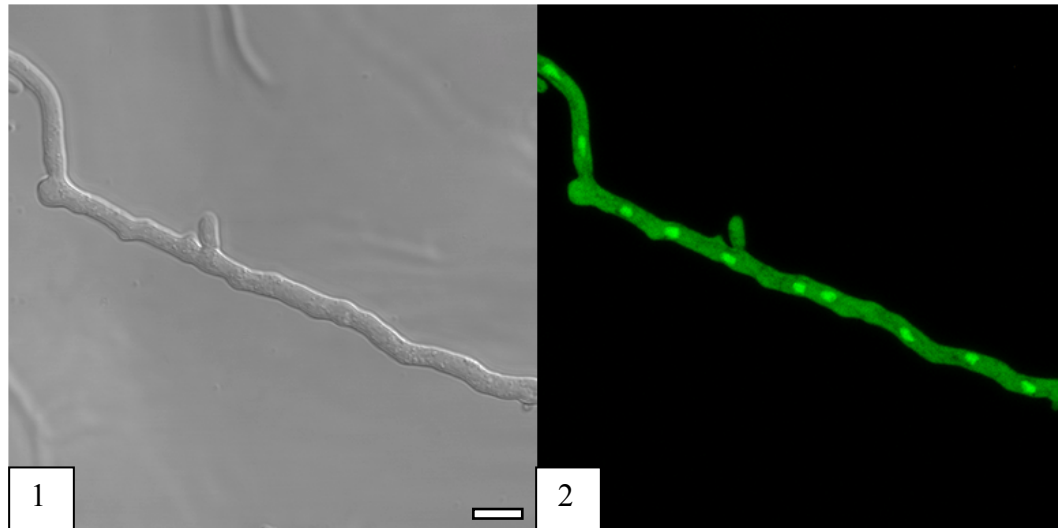
- 1: *Bright Field (Single Plane)*
- 2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

### 1.3.3. Das homologe Protein NikA ist wie TcsC im Zellkern lokalisiert

Wie zu Beginn erwähnt, bestand ein Teil der vorliegenden Arbeit darin, die homologen Proteine TcsC aus *A. fumigatus* und NikA aus *A. nidulans* miteinander zu vergleichen. Nachdem feststand, dass TcsC sich in *A. fumigatus* in den Zellkernen der Hyphen befindet, sollte nun vergleichend die Lokalisation von NikA in *A. nidulans* näher untersucht werden. Als Wildstamm für die folgend erläuterten Untersuchungen diente der *A. nidulans*-Stamm A26.

Es wurde ein Konstrukt erstellt, welches die zwei Gene *nikA* und *gfp* fusionierte. Nach Transformation in A26 bewirkte das Konstrukt eine Expression des Fusionsproteins GFP-NikA. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des

entstandenen Stammes A26 *gfp-nikA* zeigte, dass GFP-NikA ebenfalls im Zellkern lokalisiert war (siehe Abbildung 20). Es konnte zudem genau wie bei TcsC beobachtet werden, dass die Lage von GFP im Fusionsprotein mit NikA keine Auswirkungen auf dessen Lokalisation hatte. Das Fusionsprotein NikA-GFP war in A26 ebenfalls im Zellkern lokalisiert (siehe Anhang Abbildung A 10).



**Abbildung 20: A26 *gfp-nikA***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

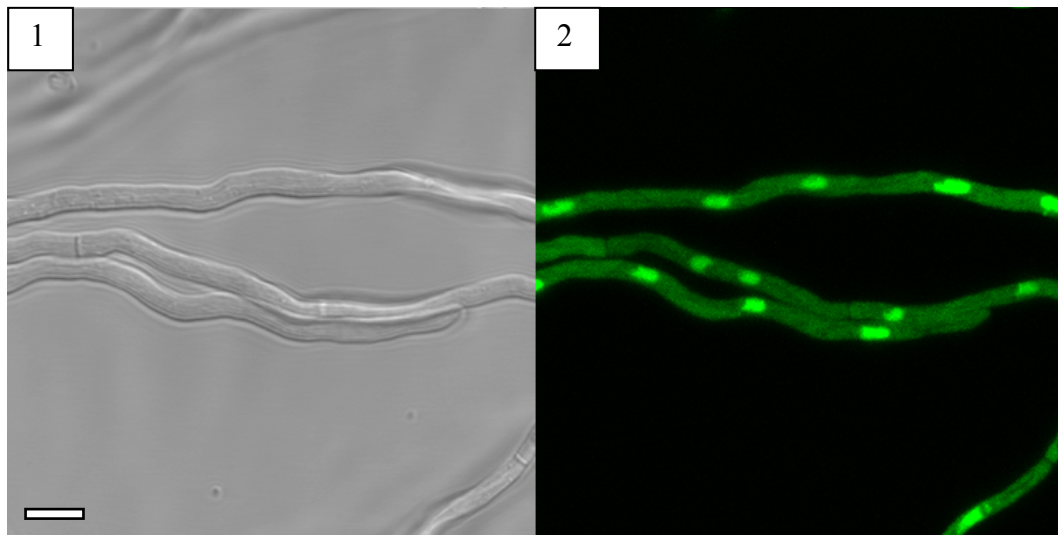
Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

#### 1.3.4. TcsC befindet sich sowohl bei homologer als auch bei heterologer Expression in den Zellkernen eines Pilzes

Ein Vergleich von TcsC und NikA erwies, dass die homologen Proteine in ihren jeweiligen Pilzspezies *A. fumigatus* und *A. nidulans* die gleiche Lokalisation aufwiesen. Es war jedoch bislang unklar, ob die Lokalisation der Gruppe III-HHKs spezifisch für ihre jeweilige Pilzspezies war, oder ob die Proteine heterolog exprimiert ebenso in der Lage wären, in den Zellkern zu gelangen. Um dies herauszufinden, wurde TcsC als Fusionsprotein mit GFP heterolog in *A. nidulans* exprimiert und der Stamm anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Ausgangsstamm für die Transformation diente eine  $\Delta nikA$  Mutante, damit das native NikA-Molekül aus A26 die Lokalisation von TcsC nicht beeinflussen konnte. Nach Abschluss der Studie konnte festgestellt werden, dass der Stamm A26  $\Delta nikA$  + *gfp-tcsC* genau wie A26 *gfp-nikA* eine Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne aufwies (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: A26  $\Delta nikA$  + *gfp-tcsC***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

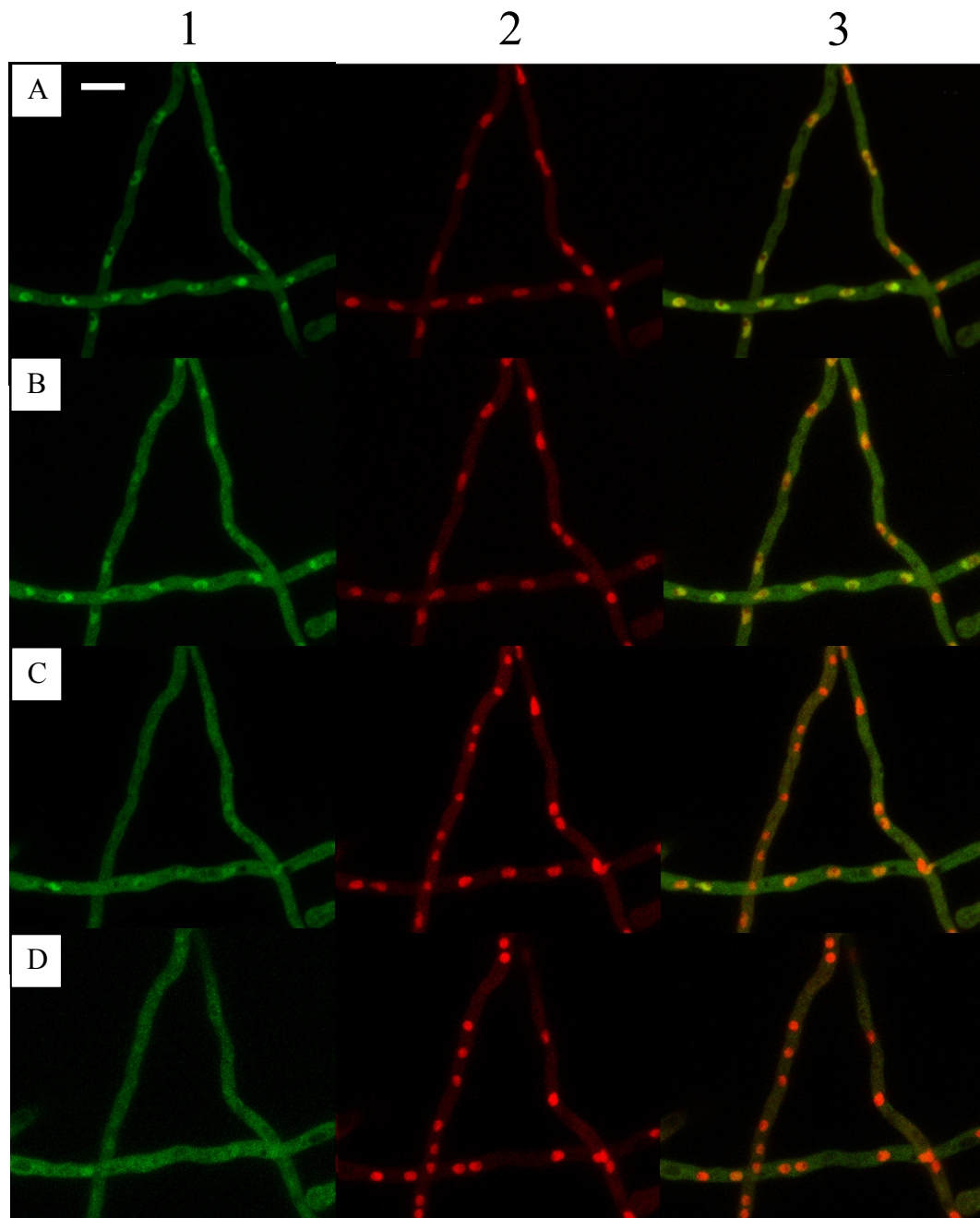
1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

### 1.3.5. Die Aktivierung von TcsC durch Stressoren führt zu einer Translokation des Proteins in das Zytoplasma

Die bislang geschilderten Untersuchungen dokumentierten stets die Lokalisation des inaktiven TcsC-Moleküls. Es war jedoch zudem von Interesse, wo das Protein in seinem aktiven Zustand lokalisiert war. Um dies in Erfahrung zu bringen, wurden die nachfolgend beschriebenen und in den Abbildungen 22 - 24 dargestellten Studien an den Stämmen AfS35 *gfp-tcsC* + *rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub>* und AfS35 *gfp-tcsC* durchgeführt. Zum einen wurde AfS35 *gfp-tcsC* + *rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub>* Stress durch Fludioxonil ausgesetzt und die Reaktion des Pilzes darauf fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Pilzstamm wurde hierbei in AMM-Flüssigmedium angezogen und das Medium zu Beginn der Studie mit 1 µg/ml Fludioxonil versetzt. Daraufhin wurde der Stamm über einen Zeitraum von 80 - 200 Minuten nach Fludioxonil-Zugabe fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Eine Untersuchung direkt ab dem Zeitpunkt der Zugabe des Stressors stellte sich als nicht praktikabel heraus, da das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine nach häufigen Bildaufnahmen ausgeblendet wurde und so die Translokation des TcsC-Moleküls nicht mehr darstellbar war. Bildaufnahmen, die direkt nach Fludioxonil-Zugabe gestartet wurden, zeigten, dass innerhalb von 80 Minuten keine Veränderung des Fluoreszenzsignals stattfand. 60 – 80 Minuten nach dem Start der Aufnahmen waren die Bilder noch auswertbar, danach nahm die Stärke des

Fluoreszenzsignals durch den Ausbleicheffekt deutlich ab. Die Bildaufnahmen der Folgeuntersuchung wurden aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchung 80 Minuten nach Fludioxonil-Zugabe begonnen. Es konnte festgestellt werden, dass das Fusionsprotein GFP-TcsC nach 80-120 Minuten unter Fludioxonil-Einfluss den Zellkern verließ und in das Zytoplasma auswanderte. Das Fusionsprotein RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> dagegen durchlief keine Translokation, sondern verblieb im Zellkern (siehe Abbildung 22). Dank dieser Zellkern-Fluoreszenzmarkierung konnte neben der Translokation von TcsC in das Zytoplasma eine für den Einfluss von Fludioxonil typische, vermehrte Zellkernbildung in den Hyphen dargestellt werden (siehe Abbildung 22 A vs. D).



**Abbildung 22: AfS35 *gfp-tcsC* + *rfp-stuA<sub>C</sub>-Terminus* unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

A: ohne Fludioxonil

B: 80 min nach Fludioxonil-Zugabe

C: 120 min nach Fludioxonil-Zugabe

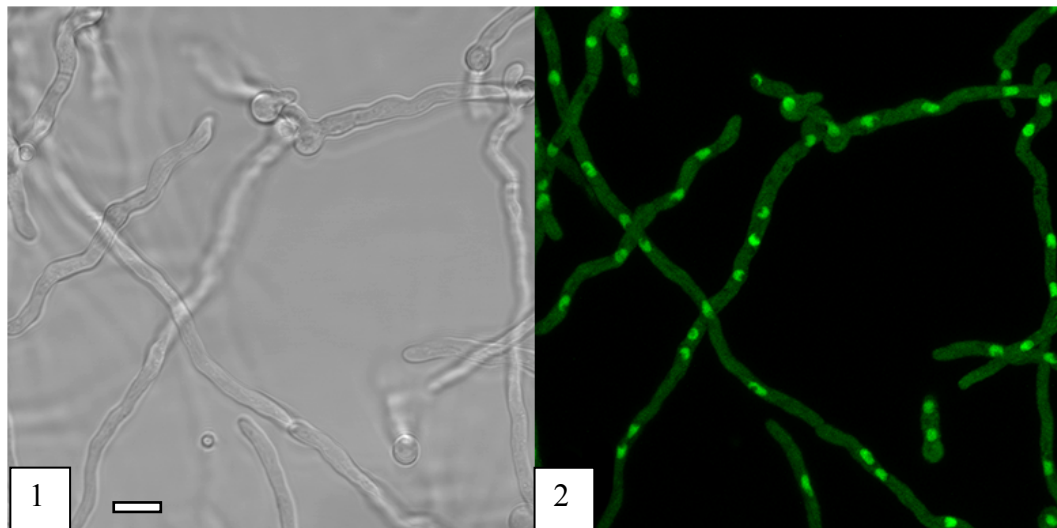
D: 200 min nach Fludioxonil-Zugabe

1: GFP (*Maximum Intensity Projection*)

2: RFP (*Maximum Intensity Projection*)

3: Overlay (*Maximum Intensity Projection*)

Da es sich bei Fludioxonil um eine künstliche Aktivierung von TcsC handelte, sollte zusätzlich untersucht werden, wie sich das Protein unter natürlichen Stressbedingungen verhält. Dazu wurde eine Studie durchgeführt, welche im Aufbau der zuvor beschriebenen Untersuchung mit Fludioxonil glich. Es wurde jedoch der Stamm AfS35 *gfp-tcsC* verwendet und dem AMM-Flüssigmedium Sorbitol mit einer Endkonzentration von 1,2 M zugesetzt. Durch die Zugabe von Sorbitol wurde der Pilz hyperosmolarem Stress ausgesetzt. Abbildung 23 zeigt AfS35 *gfp-tcsC* vor der Sorbitol-Zugabe, das Fusionsprotein GFP-TcsC war in den Zellkernen lokalisiert. Abbildung 24 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse, welche den Einfluss des hyperosmolaren Mediums auf den Pilz dokumentieren. Durch den entstandenen osmotischen Gradienten wurden die Hyphen zuerst stark angegriffen, was sich durch ein Schrumpfen des Zytoplasmas und ein Ablösen der Zellmembran von der Zellwand äußerte. Nach ca. 30 Minuten unter Sorbitol-Einfluss fand eine Translokation des Fluoreszenzsignals aus den Zellkernen statt. GFP-TcsC lag daraufhin in der direkten Peripherie der Zellkerne sowie zum Teil indistinkt im Zytoplasma verteilt vor. Nach 2 Stunden zeigten die Hyphen wieder einen annähernd physiologischen Phänotyp. Zu diesem Zeitpunkt hatte auch eine Relokalisation des Fusionsproteins GFP-TcsC zurück in den Zellkern stattgefunden.



**Abbildung 23: AfS35 *gfp-tcsC***

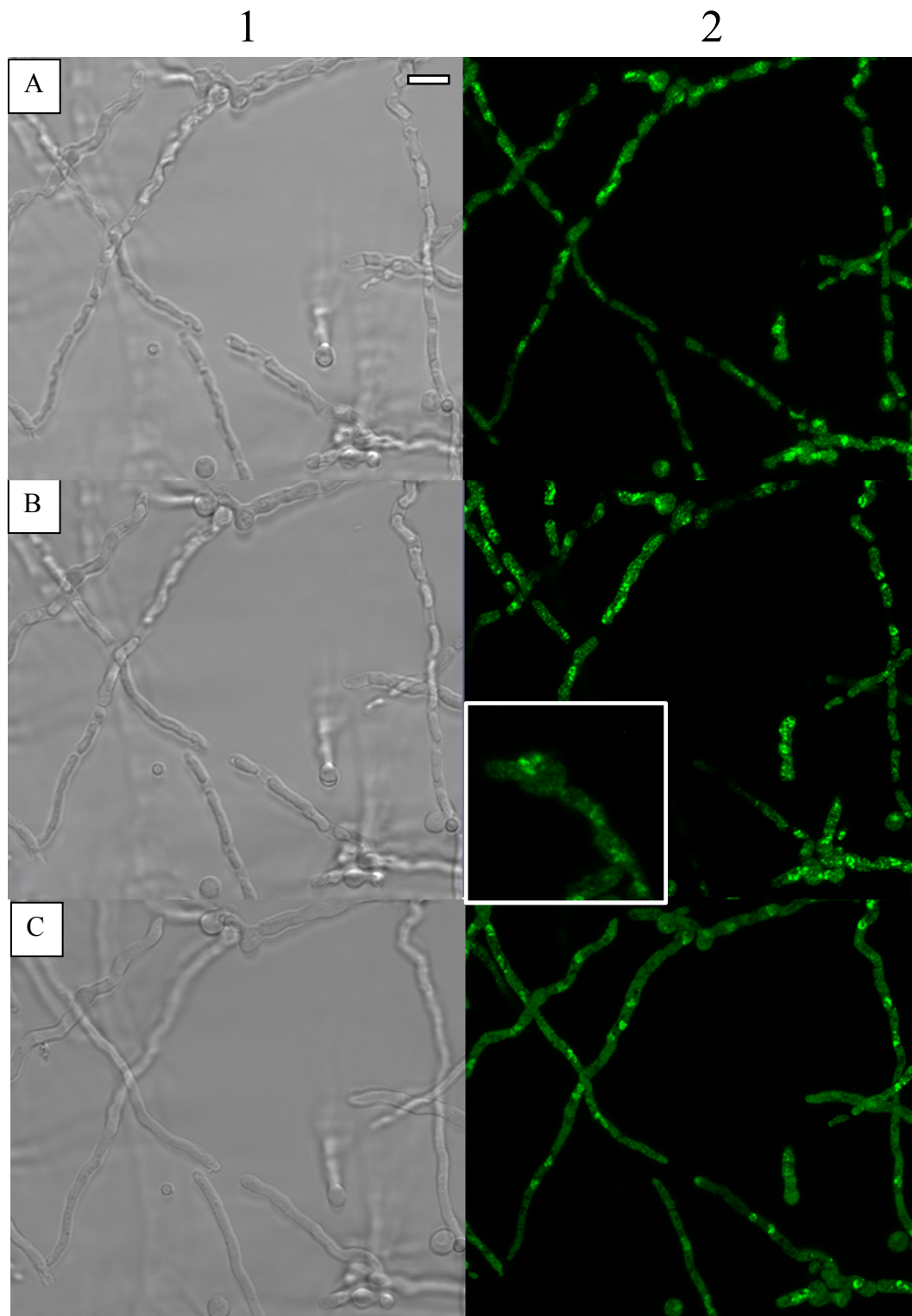
Aufnahmen in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*





**Abbildung 24: AfS35 *gfp-tcsC* unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

A: 2 min nach Sorbitol-Zugabe

B: 30 min nach Sorbitol-Zugabe

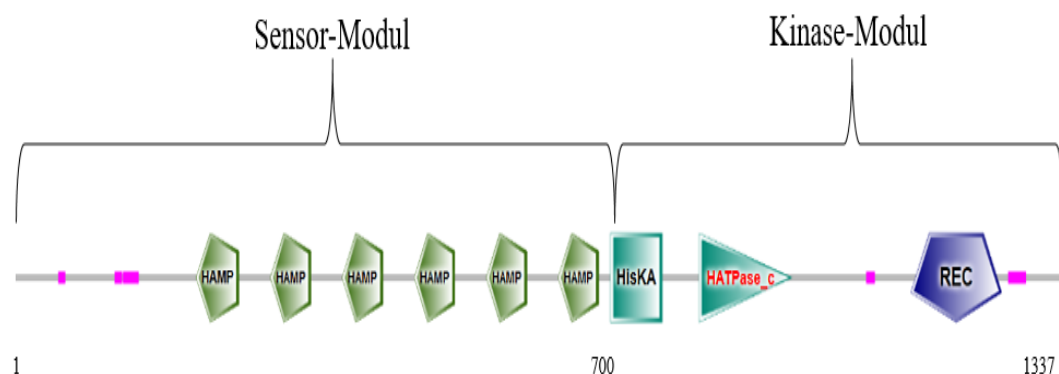
C: 2 h nach Sorbitol-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

### 1.3.6. Der C-terminale Abschnitt von TcsC ist für die Translokation des Proteins verantwortlich

Die Translokation von TcsC aus dem Zellkern in die zytoplasmatische Zellkernperipherie stellte eine interessante Beobachtung dar, die in ihrer Bedeutung weiter untersucht werden sollte. Um die Funktionsweise des Proteins besser verstehen zu können, wurden weitere Studien zur Charakterisierung von TcsC durchgeführt. Sie beschäftigten sich mit der Frage, welcher Abschnitt des Proteins für die Translokation in das Zytoplasma ausschlaggebend ist. Die Lokalisationsänderung hing offenbar mit der Aktivität des Proteins zusammen, demnach seiner Funktion als Kinase. Deshalb war die Theorie naheliegend, dass das Kinase-Modul am C-Terminus des Proteins einen Einfluss auf die Translokation haben könnte. Um dies zu untersuchen, wurde ein Konstrukt erstellt, bei dem ein TcsC-Molekül um seinen C-Terminus verkürzt wurde. Dieses Konstrukt beinhaltete die Aminosäuren TcsC<sub>1-746</sub>, dem Teilprotein fehlte demnach das Kinase-Modul. Eine schematische Darstellung des TcsC-Proteins mit seinen unterschiedlichen Domänen zeigt Abbildung 25.

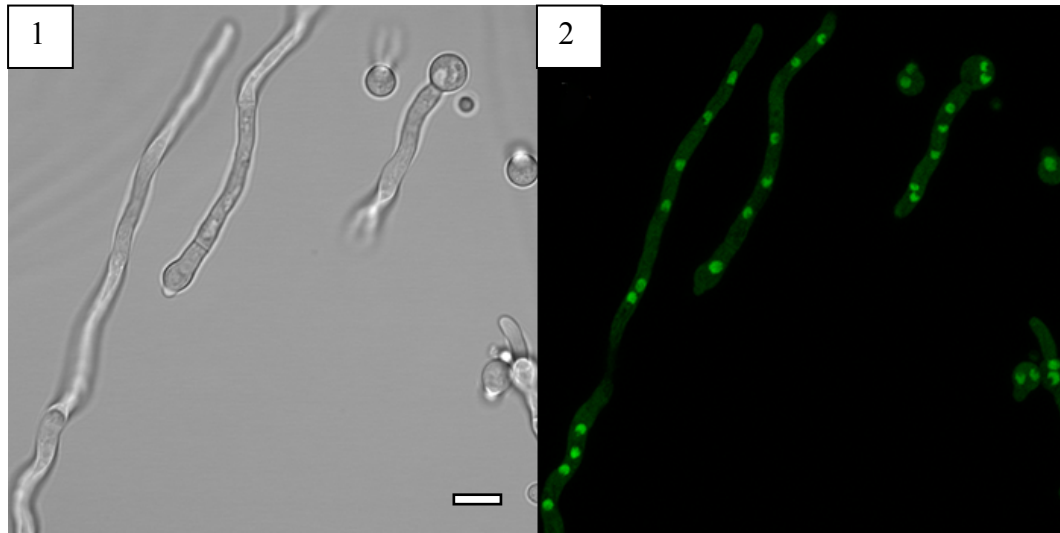


**Abbildung 25: Die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC aus *A. fumigatus* (TcsC<sub>1-1337</sub>)**

HAMP:	HAMP-Domäne
HisKA:	Histidin-Kinase A-Subdomäne
HATPase_c:	Histidin-Kinase-ähnliche ATPase-Subdomäne
REC:	<i>receiver</i> -Domäne
pink:	<i>low complexity region</i>



Das Teilprotein TcsC<sub>1-746</sub> wurde mit GFP fusioniert und als Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen dokumentierten, wo sich das Fusionsprotein im inaktiven Zustand befand und ob es in der Lage war, nach Aktivierung durch Stressoren die bei GFP-TcsC beobachtete Translokation zu vollziehen. Abbildungen 26 und 27 zeigen die im Folgenden erläuterten Untersuchungsergebnisse. Im inaktiven Zustand befand sich das Fusionsprotein GFP-TcsC<sub>1-746</sub> genau wie GFP-TcsC im Zellkern (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>1-746</sub>**

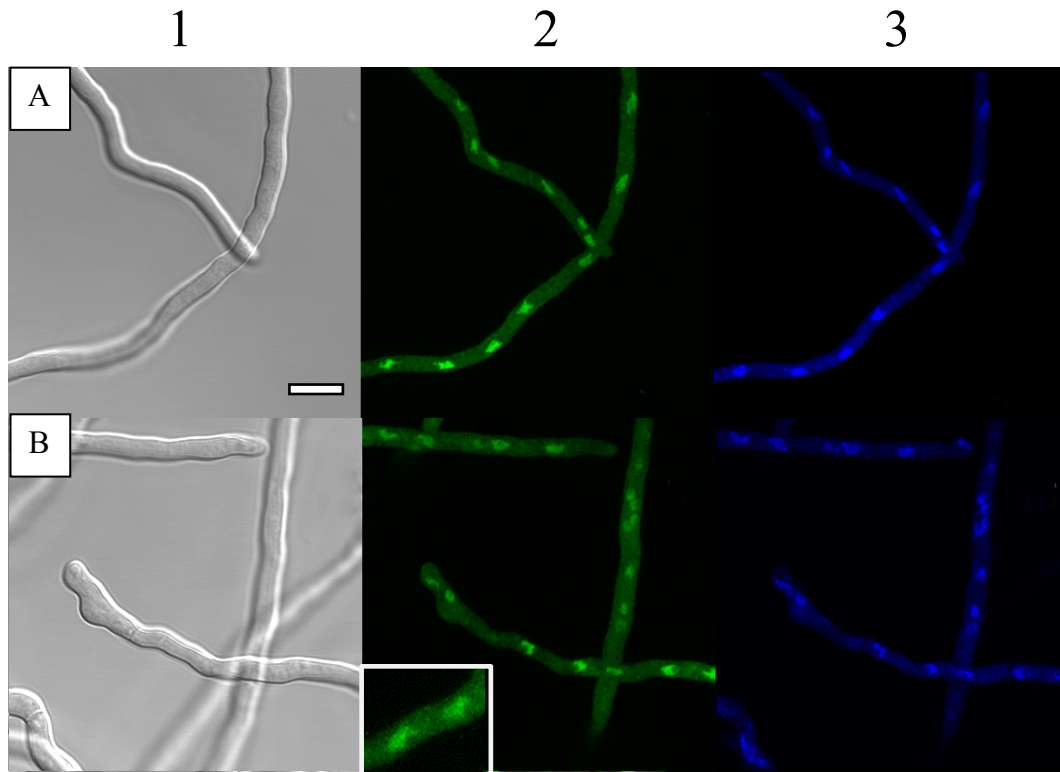
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Um herauszufinden, ob das Fusionsprotein in der Lage war, unter dem Einfluss des Stressors Fludioxonil in das Zytoplasma auszuwandern, wurde der Stamm AfS35 *gfp-tcsC*<sub>1-746</sub> über Nacht in einer 24-Well-Platte auf Deckgläschen angezogen und das Nährmedium am Folgetag mit Fludioxonil (Konzentration 1 µg/ml) versetzt. Nach je einer, zwei und drei Stunden wurden die Hyphen mit Formaldehyd fixiert und zur Zellkernfärbung auf Objektträger mit DAPI-Mounting Medium verbracht. Die Präparate wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 27 dargestellt, durchlief GFP-TcsC<sub>1-746</sub> im Gegensatz zu GFP-TcsC (siehe Abschnitt 1.3.5.) keine Fludioxonil-induzierte Translokation in das Zytoplasma.



**Abbildung 27: AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-746</sub>* unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil**

Aufnahme an konfokalem Mikroskop, fixiertes Präparat mit DAPI-Mounting Medium

Maßstab: 5 µm

A: ohne Fludioxonil

B: 120 min nach Fludioxonil-Zugabe

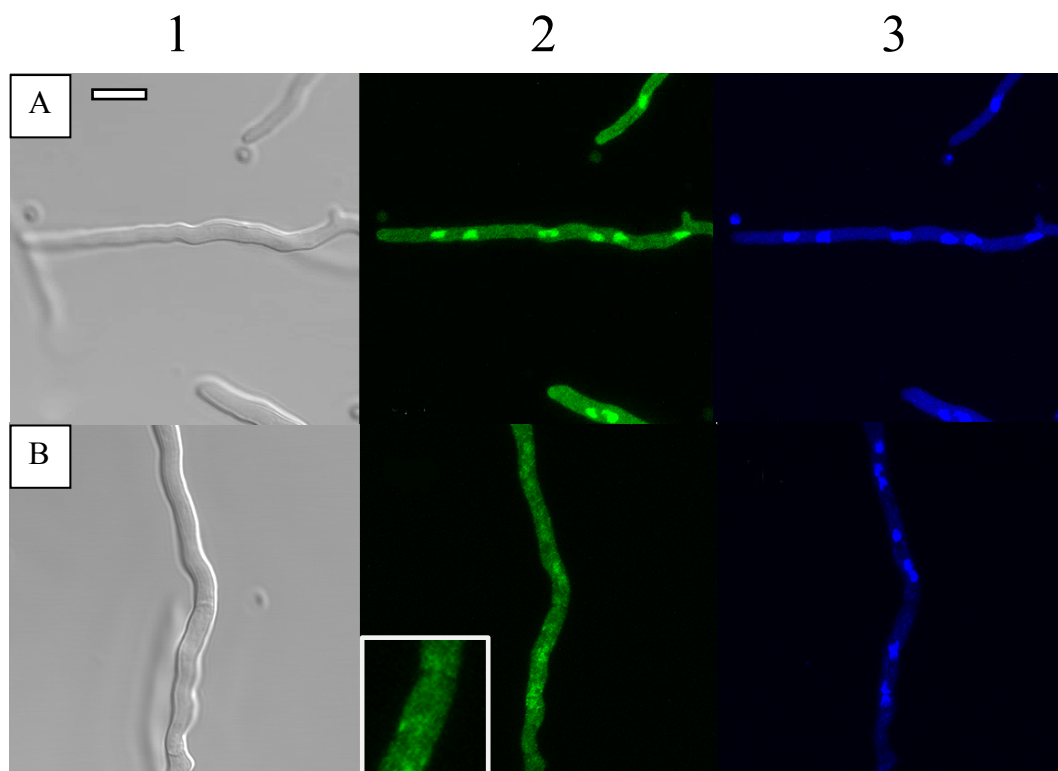
1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

3: *DAPI (Maximum Intensity Projection)*

Die Deletion des Kinase-Moduls führte dazu, dass keine Translokation mehr stattfand. Die Frage war nun, ob die Inaktivierung des Kinase-Moduls das gleiche Ergebnis liefern würde, oder ob nur dessen vollständige Entfernung die Translokation verhinderte. Dies wurde untersucht, in dem das Kinase-Modul von TcsC durch die Substitution einer Aminosäure inaktiviert wurde. Der Aminosäure TcsC<sub>771</sub> wird eine wichtige *receiver*-Funktion bei der Autophosphorylierung des Proteins im Zuge seiner Aktivierung zugeschrieben. Wird die Aminosäure TcsC<sub>771</sub>, ein Histidin (H), mittels einer Punktmutation zur Aminosäure Alanin (A) umgewandelt, so wird die Autophosphorylierung des Proteins unterbunden. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass die Mutation H771A in der Kinase-Domäne von TcsC in *A. fumigatus* zu dem Ausbleiben des Fludioxonil-Phänotyps führt (SPADINGER & EBEL, 2017). Das mutierte Protein TcsC<sup>(H771A)</sup> wurde als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Anhand des entstandenen Stammes

AfS35 *gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup>* sollte nun die Theorie getestet werden, der zufolge die Beeinträchtigung der Aktivität des Kinase-Moduls durch die Mutation H771A die Translokation des TcsC-Moleküls unter Fludioxonil-Stress verhindern würde. Analog zur Untersuchung des Stammes AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-746</sub>* wurde AfS35 *gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup>* über Nacht in einer 24-Well-Platte auf Deckgläschen angezogen und das Nährmedium am Folgetag mit Fludioxonil (Konzentration 1 µg/ml) versetzt. Nach je einer, zwei und drei Stunden wurden die Hyphen mit Formaldehyd fixiert und zur Zellkernfärbung auf Objektträger mit DAPI-Mounting Medium verbracht. Die Präparate wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Gegensatz zum Fusionsprotein GFP-TcsC<sub>1-746</sub> war das Fusionsprotein GFP-TcsC<sup>(H771A)</sup> unter dem Einfluss von Fludioxonil durchaus in der Lage, in das Zytoplasma zu translozieren (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28: AfS35 *gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup>* unter Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil**

Aufnahme an konfokalem Mikroskop, fixiertes Präparat mit DAPI-Mounting Medium

Maßstab: 5 µm

A: ohne Fludioxonil

B: 120 min nach Fludioxonil-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

3: *DAPI (Maximum Intensity Projection)*

Die Aktivität des Kinase-Moduls schien daher nicht essentiell für die Translokation des Proteins zu sein. Um besser verstehen zu können, was die Translokation von TcsC aus dem Zellkern in das Zytoplasma ermöglichte, erfolgte im Anschluss eine Analyse der Protein-Sequenz von TcsC über das Online-Programm NetNES 1.1 der *Technical University of Denmark* (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5D7E2C9A00004E3F5D666930&wait=20>). Diese Analyse zielte darauf ab, mögliche Aminosäuremuster in TcsC voraussagen zu können, die ein sogenanntes *nuclear export signal* (NES) ergeben. Solche NES ermöglichen den Transport eines Proteins aus dem Zellkern. Die Analyse ergab eine positive Voraussage für die Aminosäure TcsC<sub>1109</sub> und stand damit im Einklang mit der Erkenntnis, dass die Deletion der Aminosäuren TcsC<sub>747-1337</sub> zu einem Ausbleiben der Translokation unter Stressbedingungen führte.

#### 1.4. NLS-Motiv im N-Terminus von TcsC und NikA

Anhand der bislang geschilderten Untersuchungen konnte die zu Beginn vermutete Zellkernlokalisierung der homologen Proteinen TcsC und NikA bestätigt werden. Zudem war bei einem aktiven TcsC-Molekül eine Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma festgestellt worden. Die Lokalisation des Proteins in einer Hyphe schien demnach eine spezielle Bedeutung für dessen Aktivität zu haben. Des Weiteren konnte herausgearbeitet werden, dass die Translokation des Proteins von dessen C-Terminus abhängig war. Das um den C-Terminus verkürzte Protein TcsC<sub>1-746</sub> war im Zellkern lokalisiert, wanderte jedoch nach Aktivierung nicht in das Zytoplasma aus (siehe Abschnitt 1.3.6.). Dieses Untersuchungsergebnis ließ zudem den Rückschluss zu, dass der C-terminale Bereich von TcsC nicht für die Zellkernlokalisierung des inaktiven Proteins verantwortlich war. Die dafür verantwortliche Struktur musste vielmehr in der N-terminalen Hälfte des Proteins liegen. Als richtungsweisend bei der Suche nach dem NLS-Motiv von TcsC erwiesen sich außerdem Studien des Fusionsproteins GFP-TcsC<sub>HAMP 1-6</sub>, welches ein um 208 N-terminale Aminosäuren verkürztes TcsC-Protein (TcsC<sub>210-1337</sub>) enthält. GFP-TcsC<sub>HAMP 1-6</sub> befand sich sowohl in AfS35 als auch in AfS35  $\Delta$ tcsC im Gegensatz zu GFP-TcsC nicht in den Zellkernen einer Hyphe, sondern in deren Zytoplasma (SPADINGER & EBEL, 2017). Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass speziell der N-Terminus für die Zellkernlokalisierung des Proteins verantwortlich ist. Dieser Bereich erwies sich zudem noch auf eine andere Weise als interessant. Wie in Abschnitt 1.2. beschrieben, war das um den

N-Terminus verkürzte TcsC-Protein in seiner Aktivität eingeschränkt. Der Stamm AfS35  $\Delta tcsC + tcsC_{HAMP1-6}$  konnte sich nicht so gut an hyperosmolaren Stress anpassen wie AfS35 oder AfS35  $\Delta tcsC + tcsC$ . Aufgrund dieser Erkenntnisse widmeten sich die nachfolgend geschilderten Untersuchungen der genaueren Charakterisierung des N-Terminus von TcsC und NikA. Sie verfolgten das Ziel, die Bedeutung der N-terminalen Aminosäuresequenz hinsichtlich der Lokalisation und Aktivität der beiden Proteine zu ergründen.

#### 1.4.1. Untersuchung des N-Terminus von TcsC

Um die Theorie zu testen, dass die für die Zellkernlokalisierung verantwortliche NLS in der Proteinsequenz der Aminosäuren TcsC<sub>1-208</sub> liegt, wurde die Gensequenz dieses Abschnittes per PCR aus DNS des Stammes AfS35 amplifiziert und als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. TcsC<sub>1-208</sub> stellt hierbei den Proteinabschnitt vor der ersten HAMP-Domäne dar und wird im Weiteren als N-Terminus von TcsC bezeichnet. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Stammes AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-208</sub>* zeigte, dass das Fusionsprotein GFP-TcsC<sub>1-208</sub> im Zellkern lokalisiert war (siehe Abbildung 29).



**Abbildung 29: AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-208</sub>***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

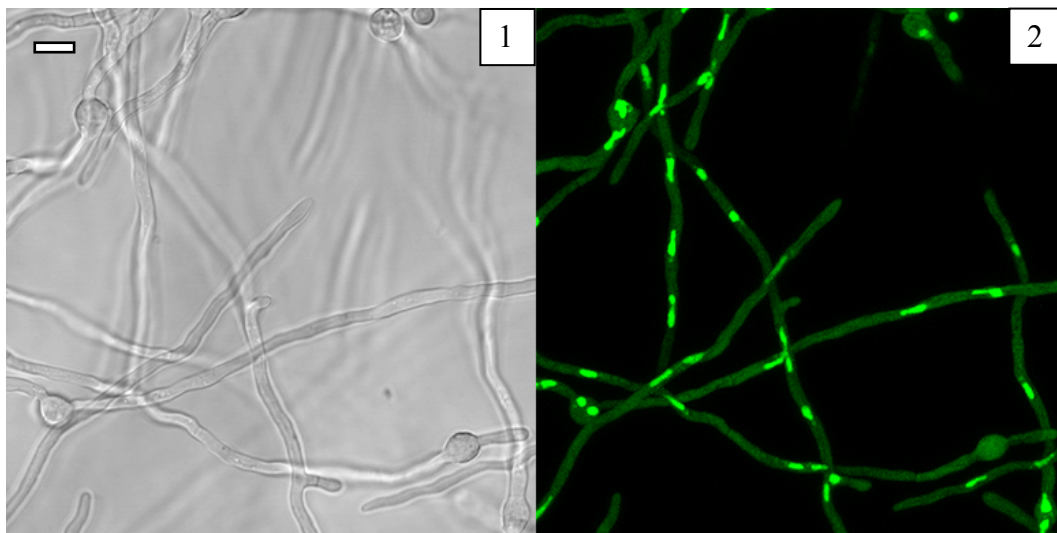
1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

#### 1.4.2. Untersuchung des N-Terminus von NikA

Das für TcsC erworbene Wissen, dass die Zellkernlokalisierung über den N-Terminus von TcsC vermittelt wird, sollte nun auch auf den N-terminalen

Abschnitt von NikA angewendet werden. Das entsprechende Gegenstück zu TcsC<sub>1-208</sub> in NikA umfasst lediglich 170 Aminosäuren. Der Diskrepanz in der Länge der jeweiligen N-Termini liegt eine geringe Sequenzkonservierung in diesem Bereich zugrunde. TcsC und NikA weisen bei einem Aminosäuresequenz-Alignment in ihrer gesamten Proteinsequenz 87 % identische Aminosäuren auf, im Bereich des N-Terminus jedoch lediglich 45 % (Aminosäuresequenz-Alignment siehe Abbildung 33 sowie Anhang Abbildung A 1). Umso interessanter war es daher, herauszufinden, ob in den gering konservierten Aminosäuresequenzen der N-Termini von TcsC und NikA ein gut konserviertes NLS-Muster vorlag. Um dies in Erfahrung zu bringen, wurde ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und NikA<sub>1-170</sub> erstellt. Das Fusionsprotein NikA<sub>1-170</sub>-GFP wies eine Zellkernlokalisation auf. Dies galt sowohl für die Expression des Fusionsproteins in A26, dargestellt in Abbildung 30, als auch für die Expression in einer *ΔnikA* Mutante (siehe Anhang Abbildung A 11).



**Abbildung 30: A26 *nikA*<sub>1-170</sub>-gfp**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

#### 1.4.3. Eingrenzung potentieller Aminosäuren der NLS bei TcsC und NikA

Es war nun sowohl für TcsC als auch NikA bekannt, dass sich die Information für die Zellkernlokalisation der Proteine in deren N-terminalen Abschnitten befindet. Um möglichst genau identifizieren zu können, welche Aminosäuren-Abfolge dafür verantwortlich war, wurde die N-terminale Sequenz weiter eingegrenzt. Im Falle

von TcsC wurden Fusionsproteine bestehend aus GFP und TcsC<sub>1-109</sub> sowie GFP und TcsC<sub>109-208</sub> erstellt und über den Vektor pSK379 in AfS35 (siehe Abbildungen 31 und 32) und A26 (siehe Anhang Abbildungen A 12 und A 13) exprimiert. Die zwei Teilproteine entsprachen jeweils einer Hälfte des N-Terminus. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-109</sub>* und AfS35 *gfp-tcsC<sub>109-208</sub>* zeigten, dass keines der beiden Fusionsproteine eindeutig im Zellkern lokalisiert war. In AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-109</sub>* reicherte sich das Fluoreszenzsignal von GFP-TcsC<sub>1-109</sub> im Zytoplasma an. Dabei lag es vereinzelt verstärkt vor, ohne distinkten Strukturen zugeordnet werden zu können (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31: AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-109</sub>***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

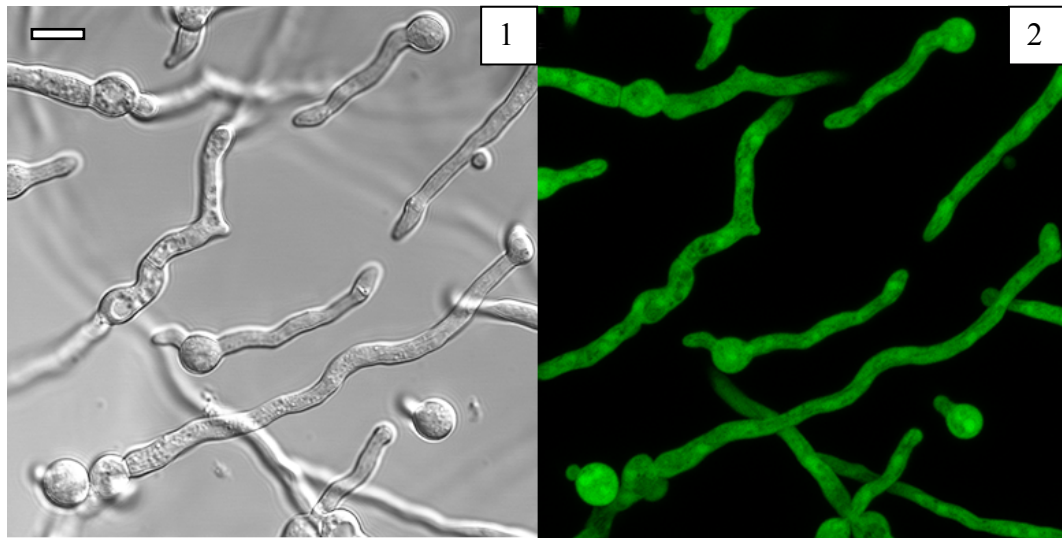
1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Im Stamm AfS35 *gfp-tcsC<sub>109-208</sub>* war das Fusionsprotein GFP-TcsC<sub>109-208</sub> ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert, es war jedoch zudem eine leichte Fluoreszenzmarkierung von Strukturen erkennbar, die den Zellkernen ähnelten (siehe Abbildung 32). Eine eindeutige Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu den Zellkernen war nicht möglich, da es trotz Durchführung unterschiedlicher Methoden im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht gelungen ist, bei vitalen, nicht fixierten Hyphen eine Zellkernfärbung durchzuführen. Dies war nur bei fixierten Präparaten möglich. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung vitaler Hyphen bedeutet jedoch durch eine geringere Einflussnahme auf die Zellen ein vermindertes Risiko von Artefakten, weshalb diese Methode bevorzugt wurde. Es wurde deshalb auf eine Fixierung der Hyphen und damit auf eine Zellkernfärbung



verzichtet. Die beschriebenen Lokalisationen von GFP-TcsC<sub>1-109</sub> und GFP-TcsC<sub>109-208</sub> waren auch bei einer Transformation der Konstrukte in A26 zu dokumentieren (siehe Anhang Abbildungen A 12 und A 13).



**Abbildung 32: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>109-208</sub>**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Die NLS wurde offenbar durch die Halbierung des N-Terminus weitgehend eliminiert. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde im Anschluss ein Konstrukt gefertigt, welches den N-Terminus von TcsC nicht halbierte, sondern die Aminosäuren TcsC<sub>1-162</sub> mit GFP fusionierte. Die Aminosäuren TcsC<sub>1-162</sub> wurden mit Bedacht gewählt, da in diesem Abschnitt des N-Terminus zwei Bereiche mit einer auffälligen Ansammlung saurer bzw. basischer Aminosäuren vorliegen. Das Auftreten dieser Aminosäure-Cluster war sowohl bei TcsC als auch bei zu TcsC homologen Proteinen anderer *Aspergillus* spp. konsistent (siehe Abbildung 33 sowie Anhang Abbildung A 1).

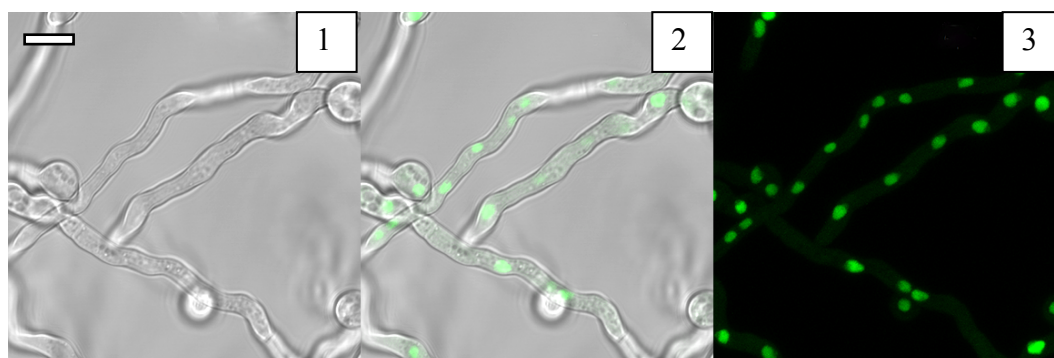




**Abbildung 33: Aminosäuresequenz-Alignment von TcsC<sub>1-234</sub> und NikA<sub>1-196</sub>**

Grün:                    basische Aminosäuren  
 Rot:                    saure Aminosäuren  
 .                        ähnliche Aminosäuren  
 :                        sehr ähnliche Aminosäuren  
 \*                        identische Aminosäuren

Das Konstrukt *gfp-tcsC<sub>1-162</sub>* wurde in AfS35 transformiert, das resultierende Fusionsprotein wies eine Zellkernlokalisierung auf (siehe Abbildung 34).



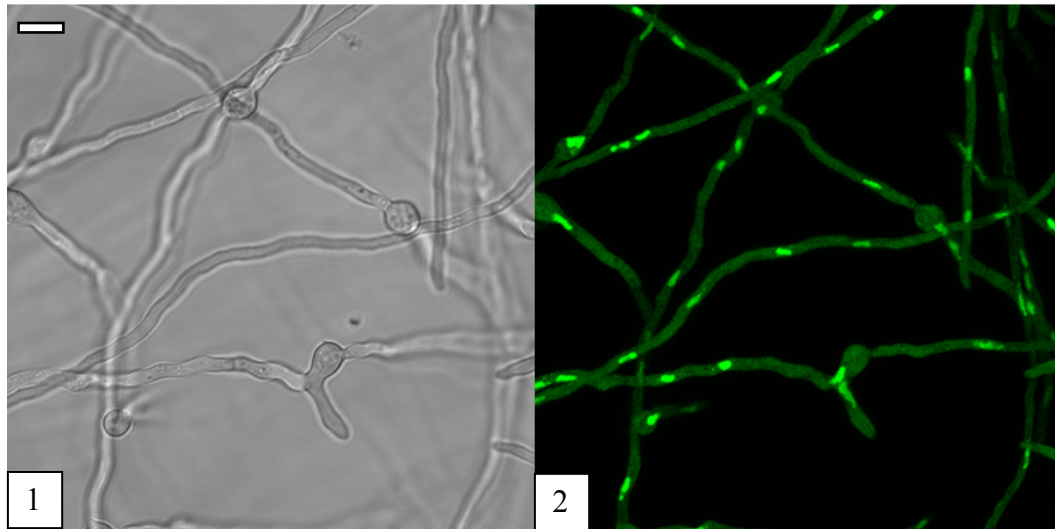
**Abbildung 34: AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-162</sub>***

Aufnahme in Life Cell Imaging-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab:            5 µm

- 1:                    Bright Field (Single Plane)
- 2:                    Overlay (Single Plane)
- 3:                    GFP (Maximum Intensity Projection)

Die NLS liegt bei TcsC offenbar im N-terminalen Bereich von TcsC<sub>1-162</sub>. Um dieses Erkenntnis auf NikA zu übertragen, wurde ein vergleichbares Konstrukt für NikA angefertigt. Ein Fusionsprotein bestehend aus den zu TcsC<sub>1-162</sub> homologen Aminosäuren NikA<sub>1-124</sub> (siehe Abbildung 33) sowie GFP zeigte in A26 ebenfalls eine Zellkernlokalisierung (siehe Abbildung X).



**Abbildung 35: A26 *nikA*<sub>1-124</sub>-gfp**

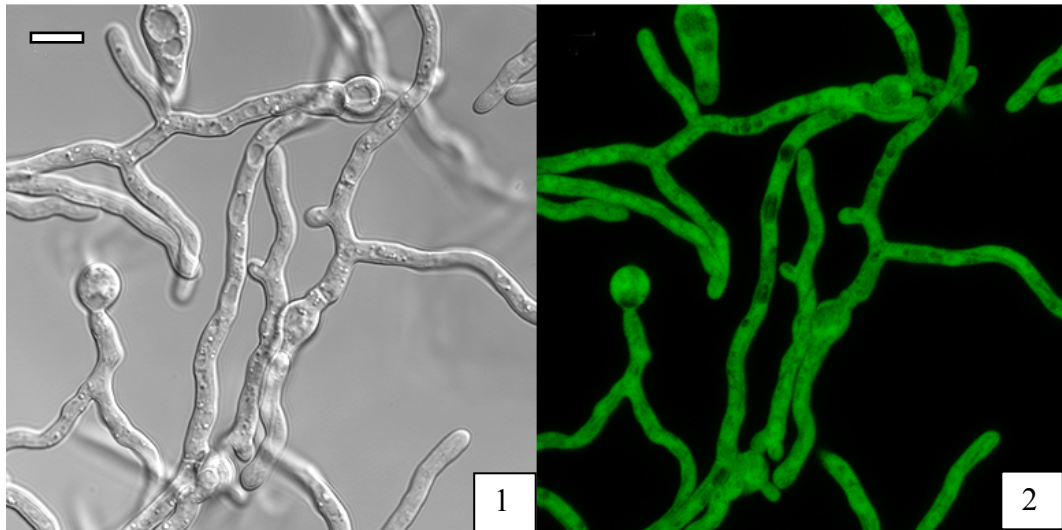
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Um die NLS bei TcsC von N-terminaler Seite aus noch weiter eingrenzen zu können, wurde ein weiteres Konstrukt hergestellt, welches ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und den Aminosäuren TcsC<sub>87-162</sub> in AfS35 exprimierte. Dieses Fusionsprotein war allerdings nicht mehr im Zellkern, sondern im Zytoplasma lokalisiert (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36: AfS35 *tcsC*<sub>87-162</sub>-gfp**

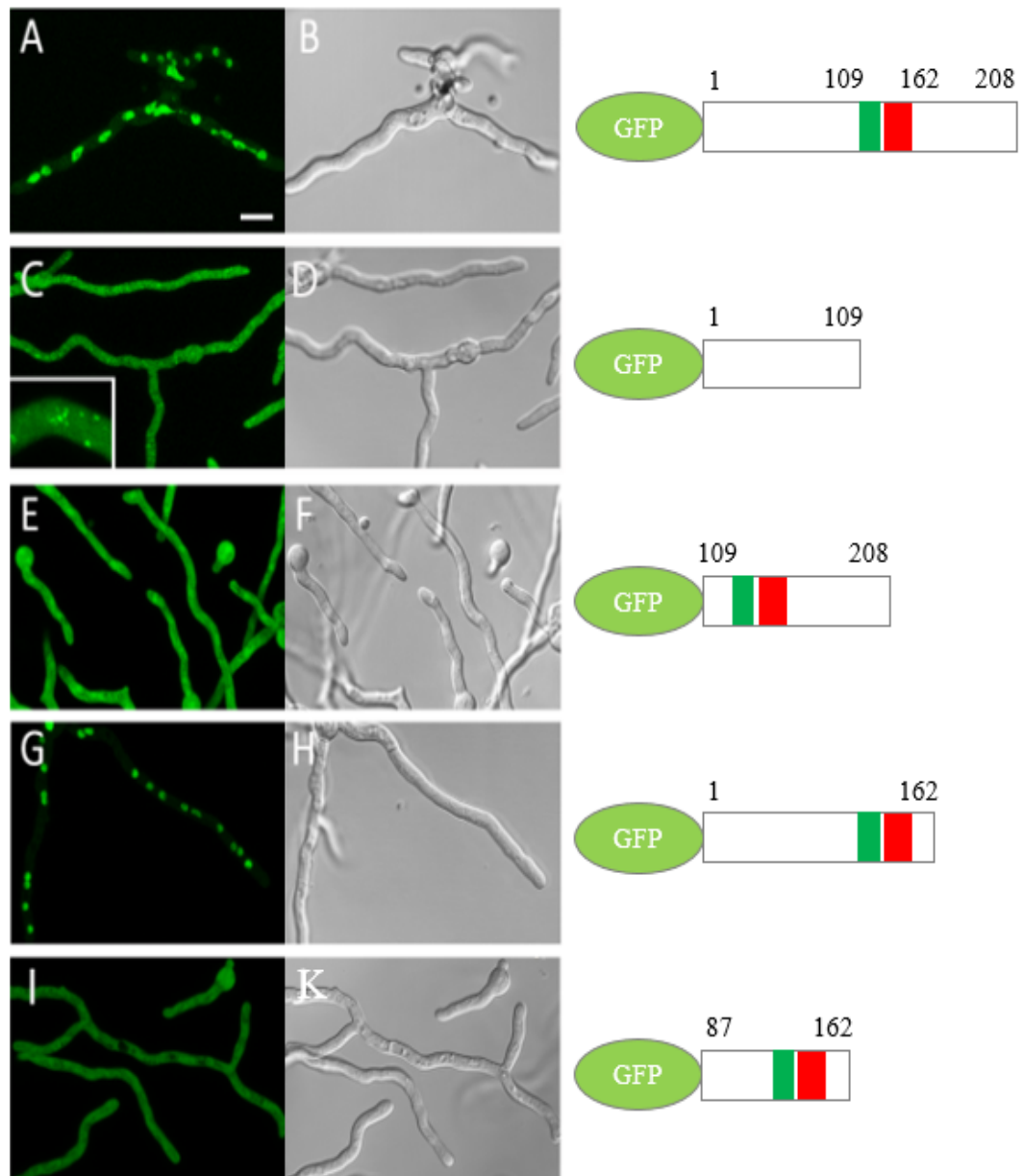
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Eine schematische Darstellung aller für TcsC angefertigten Konstrukte sowie die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der entsprechenden Fusionsproteine in AfS35 sind in Abbildung 37 zu finden.



**Abbildung 37: Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der NLS von TcsC in AfS35**

**Aufnahmen in *Life Cell Imaging*-Kammern an konfokalem Mikroskop**

Maßstab: 5 µm

A, C, D, E, G und I: GFP (*Maximum Intensity Projection*)

B, D, F, H und K: *Bright Field (Single Plane)*

A, B: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>1-208</sub>

C, D: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>1-109</sub>

E, F: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>109-208</sub>

G, H: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>1-162</sub>

I, K: AfS35 *gfp-tcsC*<sub>87-162</sub>

**Schematische Darstellung der Fusionsproteine**

Roter Bereich: saures Aminosäure-Cluster

Grüner Bereich: basisches Aminosäure-Cluster

#### 1.4.4. Manipulation des NLS-Motivs im N-Terminus von TcsC und NikA

Der N-Terminus von TcsC und NikA konnte als essentiell für die Zellkernlokalisation der Proteine charakterisiert werden. Anhand der zuvor geschilderten Untersuchungen konnte die NLS sowohl bei TcsC als auch bei NikA auf den Anfang des N-terminalen Bereiches bis hin zu den auffälligen Clustern geladener Aminosäuren begrenzt werden, also speziell die Aminosäuren TcsC<sub>1-162</sub> bzw. NikA<sub>1-124</sub>. Die Cluster geladener Aminosäuren alleine konnten jedoch keine Zellkernlokalisation hervorrufen, ebenso wenig der N-terminale Abschnitt vor diesen Clustern.

Die folgenden Untersuchungen zielten nun darauf ab, herauszufinden, inwieweit Manipulationen der zuvor näher eingegrenzten NLS die Lokalisation des Proteins im Zellkern beeinträchtigen würden.

Um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Aminosäuren im N-Terminus am ehesten für die Zellkernlokalisation verantwortlich sein könnten, wurde die Proteinsequenz von TcsC durch zwei unterschiedliche Online-Programme analysiert, die Vorhersagen zu putativen NLS in einer Aminosäuresequenz treffen. Die Analysen ergaben recht unterschiedliche Ergebnisse. Das Online-Tool cNLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_v.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_v.cgi)) prognostizierte bei TcsC ausschließlich für die im C-terminalen Bereich befindlichen Aminosäuren TcsC<sub>1007-1033</sub> und TcsC<sub>1162-1213</sub> mögliche NLSs (siehe Abbildung 38).

## cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence	
MTGADETLTAASAILQTLARGPDASISDPNSSHKTTNGCDTKFAKLPGEP	50
SQAKAAFEFELEALIRRVRLHLEFQVVSHPYPRPAPELPLSSTKNSDFLW	100
LFGLSRLSSHEGAASNSSCGMQQETSRRRQRTTRIRREAEDNEADEALDD	150
DDSDDVDSDRTRLVREEDISYLRNHVQKQAEESFQKDIIAQVRDELLQQ	200
EEHTRRALTKVENEDVLLERELRKHQQANEAFQKALREIGGIITQVANG	250
DLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVSRVAREVGTGEI	300
LGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTDQVREIAAVTTAVAHGDLQK	350
IESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGVLGGQAQIE	400
GVQGMWNELTNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGE	450
IAELKNIINSMVDQLRQFAQEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKD	500
LTENVNRMANNLTQVREIADVTTAVAKGDLTKKVTANVQGEILD LKSTI	550
NGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTDGTLGGQAKVDNVEGKWKDLTDNVNTM	600
AQNLT SQVRSISDVTQAI AKGDL SKKIEVHAQGEILT LKVTINHMVDRLA	650
KFATELKKVARDVGVDGKMGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLT SQV	700
RAFGEITDAATDGDFTKLITVNASGEMDELKRKINKMVS NLRDSIQRNTA	750
AREAAELANRTKSEFLANMSHEIRTPMNGIIGMTQLTLDTDLLKPYTREM	800
LNVVHNLANSLLTIIDDLISKIEANRMVIESIPFTVRGTVFNALKT LA	850
VKANEFKLSLTQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGNAIKFTEHGEVK	900
LTIRKSDREQCAPNEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTTR	950
RFGGTGLGLSISKRLVNLMGDVWVTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNV	1000
IASQLM <b>PKHHRVLFIDKGQNGLQAENI IKMLKQ</b> LELEPIVVRDEDHVPP	1050
PEIQDP SGKESGHAYDVIIVDSVDTARLLRTYDDFKYVPIVLVCLVCVS	1100
LKSALDLGISSYMTTPCQPIDLGNGMLPALEGRSTPITTDHSRSFDILLA	1150
EDNDVNQKLAV <b>KI LEKHNNHNSVVGNGLEAVEAVKKRRYDVI LMDVQMPV</b>	1200
<b>MGGFEATGKIREY</b> EREAGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLSK	1250
PLKQNMQTI LKCATLGGS LLEKSERLSSSGEIHHSSEKRPGMETR	1300
SITASGSIDRGFSSPAAAKDDEIAMERVSDYRSPKAV	1337

**Abbildung 38: Die Aminosäuresequenz von TcsC nach einer Analyse durch das Online-Tool cNLS Mapper**

Im Bereich von TcsC<sub>1007-1033</sub> und TcsC<sub>1162-1213</sub> (rot markiert) werden putative NLSs vorausgesagt.

Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass nicht der C-terminale Bereich von TcsC, sondern der N-Terminus des Proteins für dessen Zellkernlokalisierung verantwortlich ist. Die Prognosen konnten damit nicht zutreffen. Ein weiteres Online-Tool gab Hinweise auf eine mögliche NLS im N-Terminus von TcsC. Die Analyse der Aminosäuresequenz über das Programm NucPred des *Stockholm Bioinformatics Center* (<https://nucpred.bioinfo.se/nucpred/>) erbrachte das Ergebnis, dass die Aminosäuren TcsC<sub>127-134</sub>, demnach das bereits im Zuge der vorliegenden Arbeit als auffällig eingestufte basische Aminosäure-Cluster (siehe Abschnitt 1.4.3., Abbildung 33), an der Zellkernlokalisierung des Proteins beteiligt sein könnten. Speziell die Aminosäuren TcsC<sub>127-129</sub> wurden als wichtig eingestuft (siehe Abbildung 39).



1	MTGADETLTAASAILQTLARGPDASISDPNSSHKTNGCDTKFAKLPGEP	50
51	SQAKAAFEFELEALIRRVRHLEFQVVS HQPYPRPAPELPLSSTKNSDFLW	100
101	LFGLSRLSSHEGAASNSSCGMQQETSRRRQRTRRIRREAEDNEADEALDD	150
151	DDSDDDVDSRTRLVREEDI SYLRNHVQKQAEIISFQKDI IAQVRDELIQQ	200
201	EEHTRRALTKVENEDVLLERELRKHQQANEAFQKALREIGGIITQVANG	250
251	DLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVSRVAREVGTEGI	300
301	LGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTQVREIAAVTTAVAHGDL SQK	350
351	IESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGVLGGQAQIE	400
401	GVQGMWNETLVNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGE	450
451	IAELKNIINSMVDQLRQFAQEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKD	500
501	LTENVNRMANNLTTQVREIADVTTAVAKGDLTKKVTANVQGEILD LKSTI	550
551	NGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTDGTLGGQAKVDNVEGKWKDLTDNVNTM	600
601	AQNLT SQVRSISDVTQAI AKGDL SKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRLA	650
651	KFATELKKVARDVGVDGKMGGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQV	700
701	RAFGEITDAATDGDFTKLITVNASGEMDELKRKINKMVSNL RDSIQNTA	750
751	AREAAELANRTKSEFLANMSHEIRTPMNGIIGMTQLTLD TDDLKPYTREM	800
801	LNVVHNLANSLTLTIIDDLISKIEANRMVIESIPFTVRGTVFNALKTLA	850
851	VKANEFLSLTYQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGNAIKFTEHGEVK	900
901	LTIRKSDREQCAPNEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTTR	950
951	RFGGTGLGLSISKRLVNLMGGDVWVTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNV	1000
1001	IASQIMPYKHHRVLFIDKGQNGLQAENI IKMLKQLELEPIVVRDEDHVPP	1050
1051	PEIQDP SGKESGHAYDVIIVDSVD TARLLRTYDDFKYVPIVLVCP LCVS	1100
1101	LKSALDLGISSYMTTPCQPIDLGNGMLPALEGRSTPITTDHSRSFDILLA	1150
1151	EDNDVNQKLAVKILEKHNNHVS VVGNGL EAVEAVKRRYDVILMDVQMPV	1200
1201	MGGFEATGKIREYEREAGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLSK	1250
1251	PLKQNQMMQTILKCATLGGSLL EKSKE SRLSSGEIHHHSEGKRP GMETR	1300
1301	SITASGSIDRGFSSPAAAKDDEIAMERVSDYRSPKAV	1337

Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative  positive (nuclear)

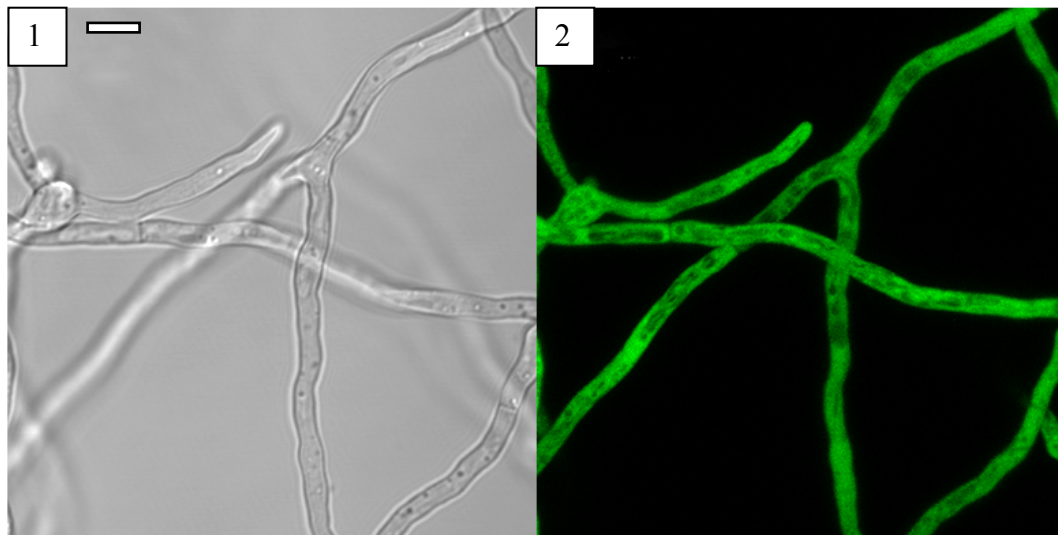
### Abbildung 39: Die Aminosäuresequenz von TcsC nach einer Analyse durch das Online-Tool NucPred

Dem basischen Aminosäure-Cluster im Bereich der Aminosäuren TcsC<sub>127-129</sub> (orange markiert) wird eine positive Einflussnahme auf einen Transport in den Zellkern vorausgesagt.

Im Hinblick darauf, dass sich die Voraussagen von NucPred mit den in den vorherigen Abschnitten erläuterten Untersuchungsergebnissen größtenteils deckten, orientierten sich die darauffolgenden Studien nun an den Ergebnissen der NucPred-Analyse. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Manipulation der Primärstrukturen von TcsC und NikA im Bereich des basischen Aminosäure-Clusters (TcsC<sub>127-137</sub> bzw. NikA<sub>92-96</sub>, siehe Abschnitt 1.4.3., Abbildung 33) eine Auswirkung auf bestimmte Protein-Protein Interaktionen haben und damit zur Einbuße der Zellkernlokalisation von TcsC bzw. NikA führen würde. Um diese Hypothese zu testen, wurden die im Folgenden näher beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

#### 1.4.4.1. Substitution und Deletion von Aminosäuren im N-Terminus eines verkürzten NikA-Teilproteins

Zuerst wurde der Proteinabschnitt NikA<sub>1-124</sub>, dessen positiver Einfluss auf die Zellkernlokalisation des Proteins bereits durch vorherige Untersuchungen etabliert wurde (siehe Abschnitt 1.4.3.), manipuliert. Dies erfolgte in Form einer Deletion der Aminosäuren NikA<sub>92-96</sub>. Dadurch wurde der Großteil des basischen Aminosäure-Clusters aus der Proteinsequenz entfernt. Das resultierende Konstrukt wurde in A26 als das Fusionsprotein NikA<sub>1-124</sub><sup>( $\Delta$ 92-96)</sup>-GFP exprimiert. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des entsprechenden Stammes A26 *nikA*<sub>1-124</sub><sup>( $\Delta$ 92-96)</sup>-*gfp* wies das Fusionsprotein eine zytoplasmatische Lokalisation auf (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40: A26 *nikA*<sub>1-124</sub><sup>( $\Delta$ 92-96)</sup>-*gfp***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

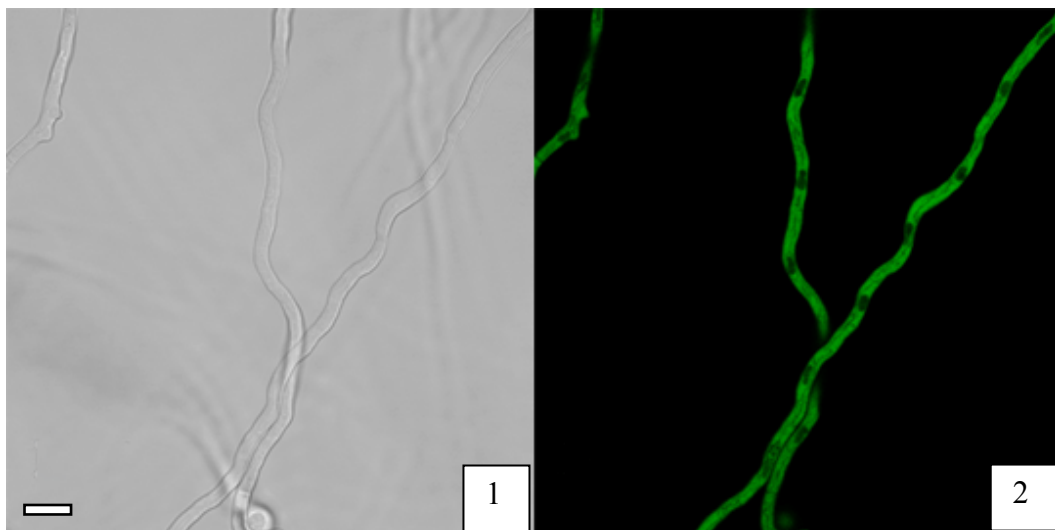
Maßstab: 5  $\mu$ m

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



Da die Deletion von fünf Aminosäuren einen nicht unerheblichen Eingriff in die Primärstruktur des Proteins darstellte, wurde getestet, ob der durch die Deletion hervorgerufene Verlust der Zellkernlokalisation auch durch einen geringeren Eingriff auf die Aminosäuresequenz möglich war. Hierfür wurde das basische Aminosäure-Cluster in NikA<sub>1-124</sub> nicht deletiert, sondern lediglich durch eine Substitution der Aminosäure NikA<sub>94</sub> manipuliert. Das für die basische Aminosäure Arginin (R) codierende Basentriplett CGG von NikA<sub>94</sub> wurde durch das Basentriplett GAG ersetzt, welches für die saure Aminosäure Glutaminsäure (E) codiert. Somit wurde das Cluster basisch geladener Aminosäuren durch eine saure Aminosäure unterbrochen. Das entstandene Protein NikA<sub>1-124</sub><sup>(R94E)</sup> wurde als NikA<sub>1-124</sub><sup>(R94E)</sup>-GFP in A26 exprimiert. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des entstandenen Stammes A26 *nikA*<sub>1-124</sub><sup>(R94E)</sup>-*gfp* konnte erneut eine zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins festgestellt werden (siehe Abbildung 41).



**Abbildung 41: A26 *nikA1-124*<sup>(R94E)</sup>-*gfp***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

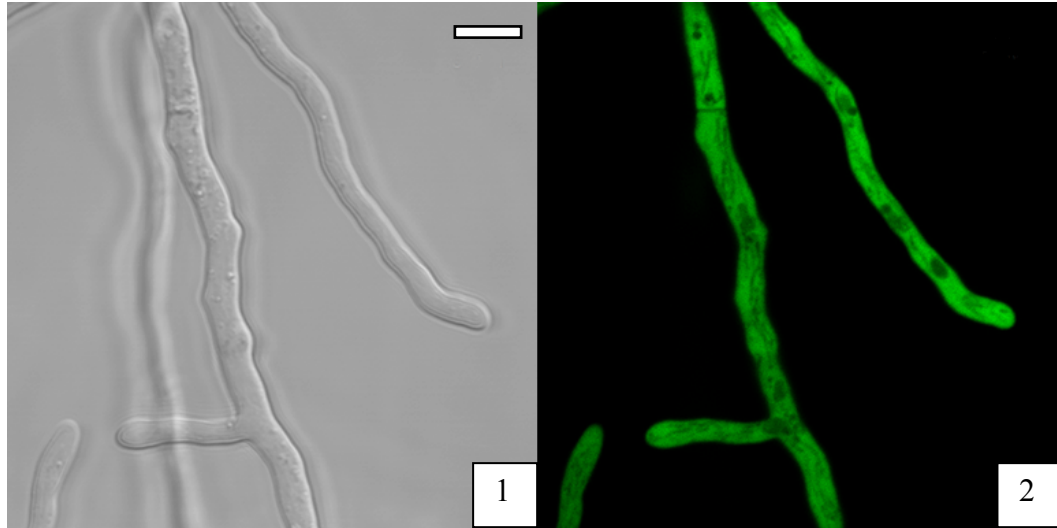
Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Sowohl die Deletion des basischen Aminosäure-Clusters als auch die Substitution einer einzelnen basischen Aminosäure in eine saure Aminosäure führte zu einem Verlust der Zellkernlokalisation von NikA<sub>1-124</sub>-GFP. Um die Sensibilität der NLS noch weiter zu testen, wurde im Anschluss erneut eine Substitution der Aminosäure NikA<sub>94</sub> durchgeführt, wobei diesmal allerdings das Basentriplett CGG des basischen Arginins durch das Basentriplett GCG ersetzt wurde, welches für die

neutrale Aminosäure Alanin (A) codiert. Diese abgeschwächte Ladungsverschiebung innerhalb der Proteinsequenz des basischen Aminosäure-Clusters führte ebenfalls dazu, dass sich das Fusionsprotein NikA<sub>1-124</sub><sup>(R94A)</sup>-GFP im Zytoplasma und nicht im Zellkern befand (siehe Abbildung 42).



**Abbildung 42:** A26 *nikA*<sub>1-124</sub><sup>(R94A)</sup>-*gfp*

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

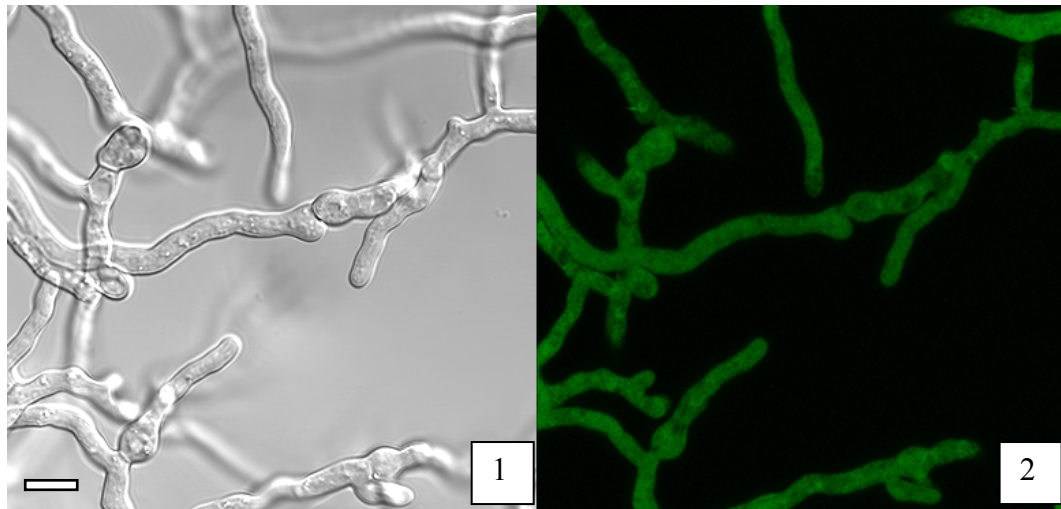
Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Single Plane)*

#### 1.4.4.2. Substitution und Deletion von Aminosäuren im N-Terminus eines verkürzten TcsC-Teilproteins

Die Charakterisierung der NLS wurde auch bei TcsC weiter vorangetrieben. Unter Berücksichtigung der bei der Untersuchung des N-Terminus von NikA gewonnenen Erkenntnisse, wurde ein Konstrukt aus GFP und TcsC<sub>1-208</sub> generiert, bei welchem das basische Aminosäure-Cluster des N-Terminus durch eine Deletion der Aminosäuren TcsC<sub>127-137</sub> größtenteils eliminiert wurde. Das Ergebnis war vergleichbar mit der Deletion des homologen Sequenzbereiches in NikA. Das Fusionsprotein TcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ127-137)</sup>-GFP wies nach Expression in AfS35 eine zytoplasmatische Lokalisation auf (siehe Abbildung 43).



**Abbildung 43: AfS35  $tcsC_{1-208}(\Delta I_{27-137})$ -gfp**

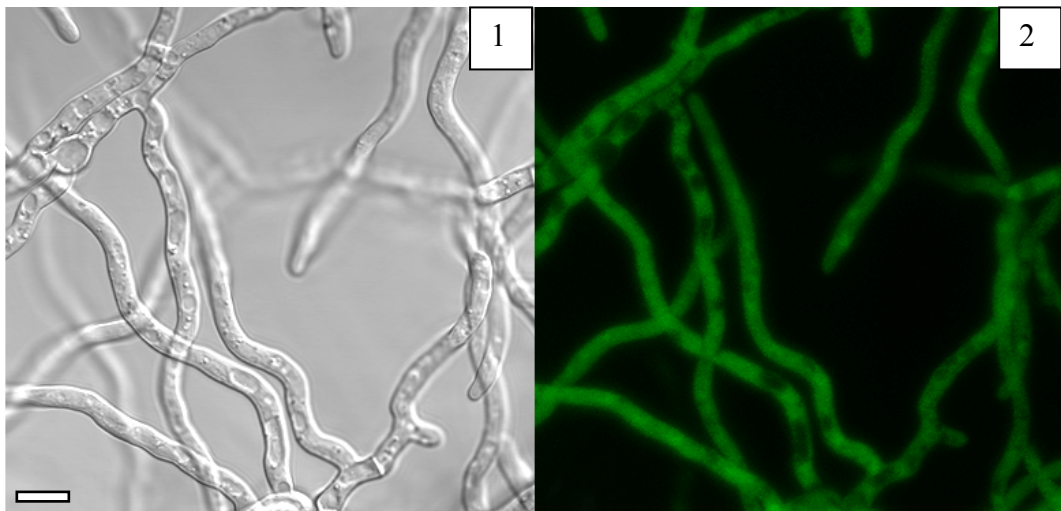
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu$ m

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Als ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert erwies sich ein Fusionsprotein aus GFP und dem Teilprotein TcsC<sub>1-208</sub>, bei welchem das basische Aminosäure-Cluster, analog zu den Untersuchungen bei NikaA, durch die Substitution einer basischen Aminosäure in eine saure Aminosäure manipuliert wurde (siehe Abbildung 44). Hierbei wurde die Aminosäure TcsC<sub>129</sub> durch den Austausch des für das basische Arginin (R) codierenden Basentriplets CGT in das für die saure Aminosäure Asparaginsäure (D) codierende Basentriplett GAT umgewandelt.



**Abbildung 44: AfS35  $tcsC_{1-208}(R129D)$ -gfp**

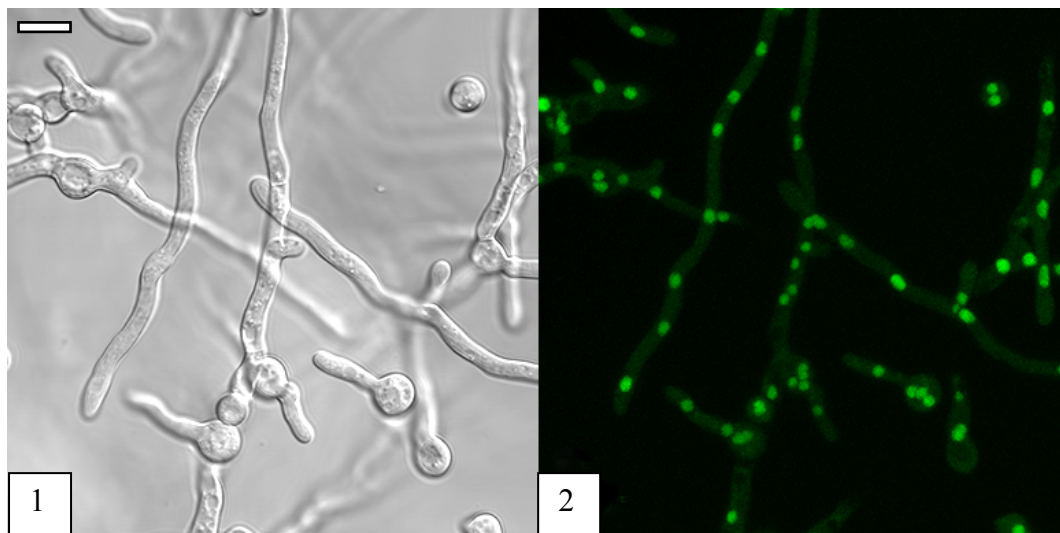
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu$ m

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Das Muster basischer Aminosäuren im N-Terminus der Proteine NikA und TcsC schien demnach einen essentiellen Bestandteil der NLS darzustellen. Nach dieser Erkenntnis sollte nun zusätzlich untersucht werden, ob die ebenfalls im N-terminalen Bereich beider Proteine vorliegende, auffällige Ansammlung saurer geladener Aminosäuren (siehe Abschnitt 1.4.3., Abbildung 33) auch eine gewisse Rolle bei der Zellkernlokalisation spielte. Dazu wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem in einem TcsC<sub>1-208</sub>-GFP-Fusionsprotein die Aminosäuren TcsC<sub>145-158</sub> deletiert wurden. Nach Expression des manipulierten Fusionsproteins in AfS35 konnte interessanterweise ein deutlicher Unterschied zur Manipulation des basischen Aminosäure-Clusters herausgearbeitet werden. Das in AfS35 exprimierte Fusionsprotein TcsC<sub>1-208</sub><sup>( $\Delta$ 145-158)</sup>-GFP war, trotz des Verlustes von 14 nativen Aminosäuren, nach wie vor im Zellkern lokalisiert (siehe Abbildung 45).



**Abbildung 45:** AfS35 tcsC<sub>1-208</sub><sup>( $\Delta$ 145-158)</sup>-gfp

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

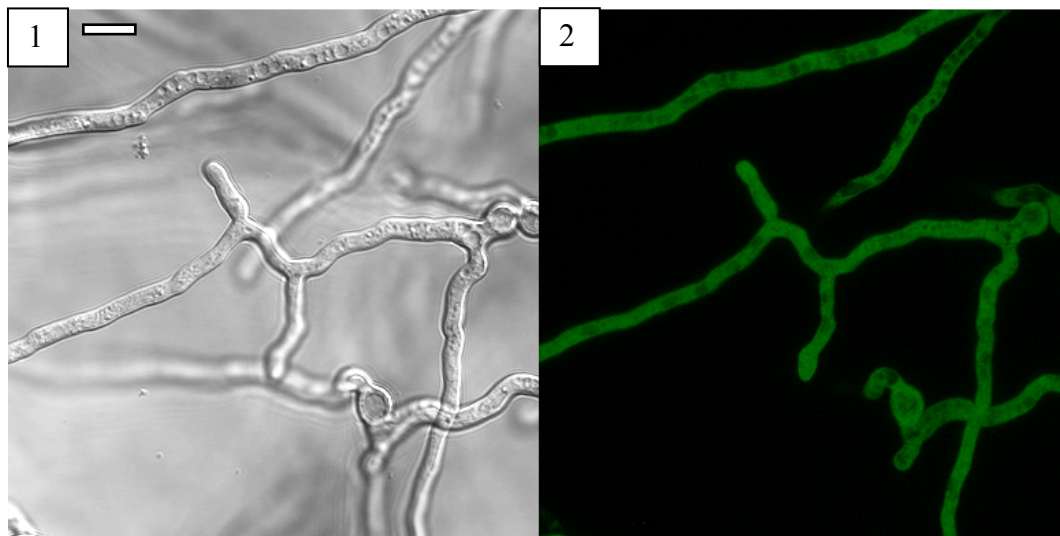
- 1: *Bright Field (Single Plane)*
- 2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

#### 1.4.4.3. Substitution und Deletion von Aminosäuren im N-Terminus eines unverkürzten TcsC-Proteins

Die zuvor geschilderten Manipulationen der N-terminalen Sequenz von TcsC hatten gezeigt, dass der Bereich des basischen Aminosäure-Clusters von herausragender Bedeutung für die Zellkernlokalisation des Proteins ist. Die Manipulationen waren dabei bislang an einem verkürzten TcsC-Teilprotein durchgeführt worden, den Aminosäuren TcsC<sub>1-208</sub>. Die Fusionsproteine TcsC<sub>1-208</sub><sup>( $\Delta$ 127-137)</sup>-GFP und TcsC<sub>1-208</sub><sup>(R129D)</sup>-GFP wiesen in AfS35 keine

Zellkernlokalisierung mehr auf. Die Auswirkungen der durchgeführten Aminosäuresubstitutionen sollten nun zusätzlich bei einem unverkürzten TcsC-Protein dokumentiert werden. Die Manipulation des Gesamtproteins bot neben der Dokumentation seiner Lokalisation zusätzlich die Möglichkeit, das manipulierte Protein hinsichtlich seiner Aktivität zu untersuchen. Damit konnte in Erfahrung gebracht werden, ob der Verlust der Zellkernlokalisierung Auswirkungen auf die Aktivität der Gruppe III-HHK haben würde.

Die in Abschnitt 1.4.4.2. beschriebene Punktmutation der Aminosäure TcsC<sub>129</sub> wurde in einem Konstrukt bestehend aus GFP sowie einem unverkürzten TcsC-Protein wiederholt. Bei der Expression des Konstruktes *gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup>* in AfS35 wies das Fusionsprotein eine zytoplasmatische Lokalisation auf (siehe Abbildung 46).



**Abbildung 46:** AfS35 *gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup>*

Aufnahme in Life Cell Imaging-Kammer an konfokalem Mikroskop

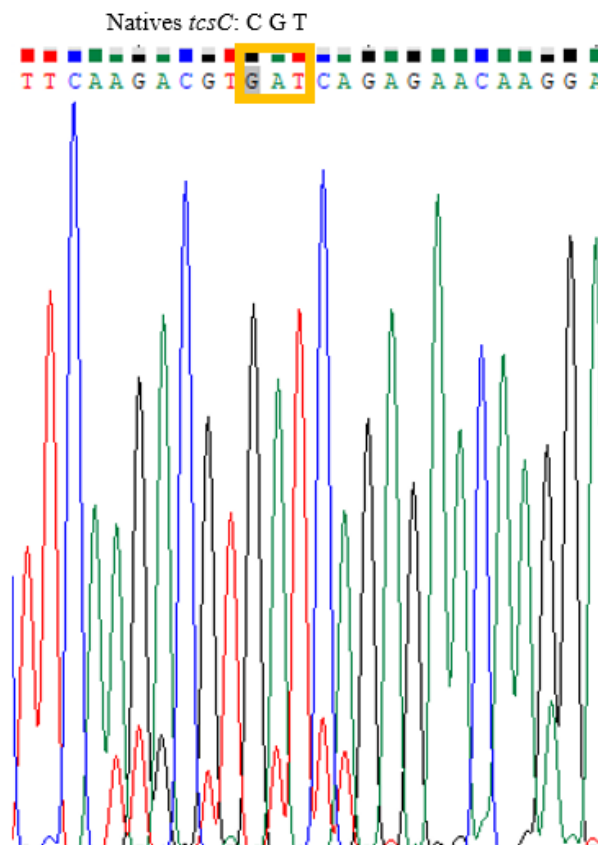
Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Neben der Lokalisation des manipulierten Proteins war nun von Interesse, ob die Substitution der Aminosäure TcsC<sub>129</sub> und damit der Verlust der Zellkernlokalisierung auch die Aktivität von TcsC beeinflussen würde. Um diese Frage zu klären, wurde dem Stamm AfS35 *tcsC<sup>(R129D)</sup>-gfp* durch eine Deletion des *tcsC*-Gens die Fähigkeit zur Expression des nativen TcsC-Proteins genommen (*tcsC*-Deletion, siehe Abschnitt 1.3.2.). Der entstandene Stamm wurde sowohl per Anzucht auf Hygromycin-Selektionsagar als auch per PCR auf die Integration der

*tcsC*-Deletionskassette in sein Genom getestet. Für letzteres wurde die DNS des Pilzstammes isoliert und daraus ein PCR-Produkt mittels der Kombination eines im *upstream*-Bereich des *tcsC*-Gens bindenden Oligonukleotids und eines im *hygromycin*-Resistenzgen der Deletionskassette bindenden Oligonukleotids amplifiziert. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der *tcsC*-Deletion die Sequenzierung eines PCR-Produktes durchgeführt, welches den Aminosäuresequenzbereich der Mutation R129D an Position TcsC<sub>129</sub> abbildete. Wäre in dem Stamm AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  noch das native *tcsC*-Gen vorhanden, wäre bei der Sequenzierung des Substitutionsbereiches das Basentriplett GAT der mutierten Aminosäure TcsC<sup>(R129D)</sup> durch das native Basentriplett CGT überlagert. Dies war jedoch nicht der Fall (siehe Abbildung 47).

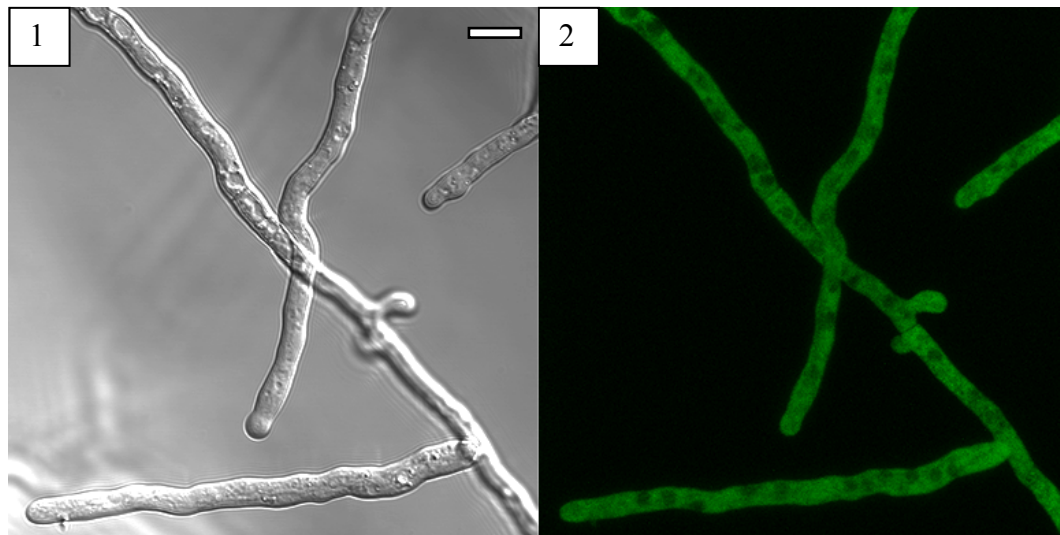


**Abbildung 47: Sequenzanalyse der Aminosäuresubstitution in AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$**

Darstellung über *Chromas* (Technelysium)

Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Stammes AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  konnte festgestellt werden, dass die Lokalisation des Fusionsproteins im Zytoplasma durch die Deletion des nativen *tcsC*-Gens nicht verändert wurde (siehe Abbildung 48).





**Abbildung 48:** AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(R129D)}$

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

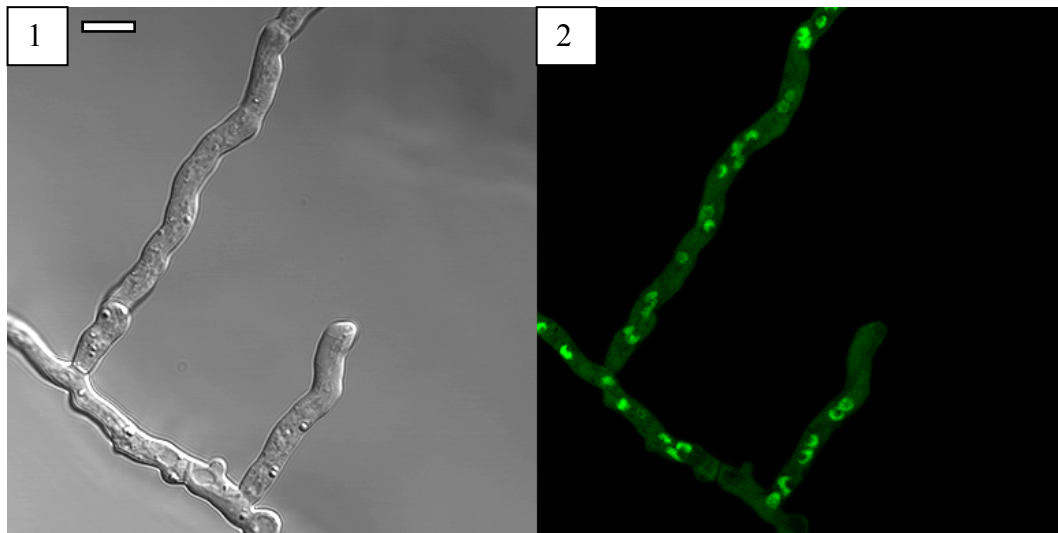
Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Um die Auswirkungen der Manipulation des basischen Aminosäure-Clusters besser einschätzen zu können, wurde zeitgleich noch eine weitere Manipulationsvariante von TcsC untersucht. Hierfür wurde in dem Protein anstatt im basischen Aminosäure-Cluster eine Aminosäure im sauren Cluster von TcsC<sub>145-158</sub> substituiert. Die Deletion des sauren Aminosäure-Clusters im N-Terminus von TcsC hatte zwar keinen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins TcsC<sub>1-208</sub><sup>( $\Delta 145-158$ )</sup>-GFP im Zellkern ergeben (siehe Abschnitt 1.4.4.2.), es sollten jedoch im Zuge der Untersuchung des mutierten TcsC<sup>(R129D)</sup>-Proteins ebenfalls die Auswirkungen der Substitution einer einzelnen Aminosäure im sauren Aminosäure-Cluster hinsichtlich der Lokalisation und Aktivität des Proteins studiert werden. Das Basentriplett GAT von TcsC<sub>155</sub>, codierend für die saure Aminosäure Asparaginsäure (D) wurde hierfür in das Basentriplett CAT der basischen Aminosäure Histidin (H) umgewandelt und somit das Muster saurer Aminosäuren im Bereich von TcsC<sub>145-158</sub> durch eine basische Aminosäure unterbrochen. Das Konstrukt wurde als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Im entstandenen Stamm wurde anschließend wie in Abschnitt 1.3.2. beschrieben das native *tcsC*-Gen deletiert. Der Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(D155H)}$  wurde analog zu der zuvor für den Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(R129D)}$  beschriebenen Vorgehensweise sowohl per Anzucht auf Hygromycin-Selektionsagar als auch per PCR auf die Integration der *tcsC*-Deletionskassette getestet. Im Anschluss wurde

eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt, welche die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> dokumentierte. Das Fusionsprotein befand sich trotz Mutation der Aminosäure TcsC<sub>155</sub> im Zellkern (siehe Abbildung 49). Bezüglich der Lokalisation war die Auswirkung der Mutation TcsC<sup>(D155H)</sup> dahingehend mit der einer Deletion der Aminosäuren TcsC<sub>145-158</sub> (siehe Abschnitt 1.4.2.2.) vergleichbar, als dass keine der beiden Mutationen die Zellkernlokalisation des GFP-TcsC-Moleküls verhinderte. Es konnte somit erneut festgestellt werden, dass die Manipulation des sauren Aminosäure-Clusters keine Auswirkungen auf die Lokalisation von TcsC hatte. Allerdings war zu beobachten, dass die Hyphen des Stammes AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  eine unphysiologisch wellige Wuchsform aufwiesen und sich an manchen Stellen verdickt und geschoppt darstellten (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 49:** AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$

Aufnahme in Life Cell Imaging-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

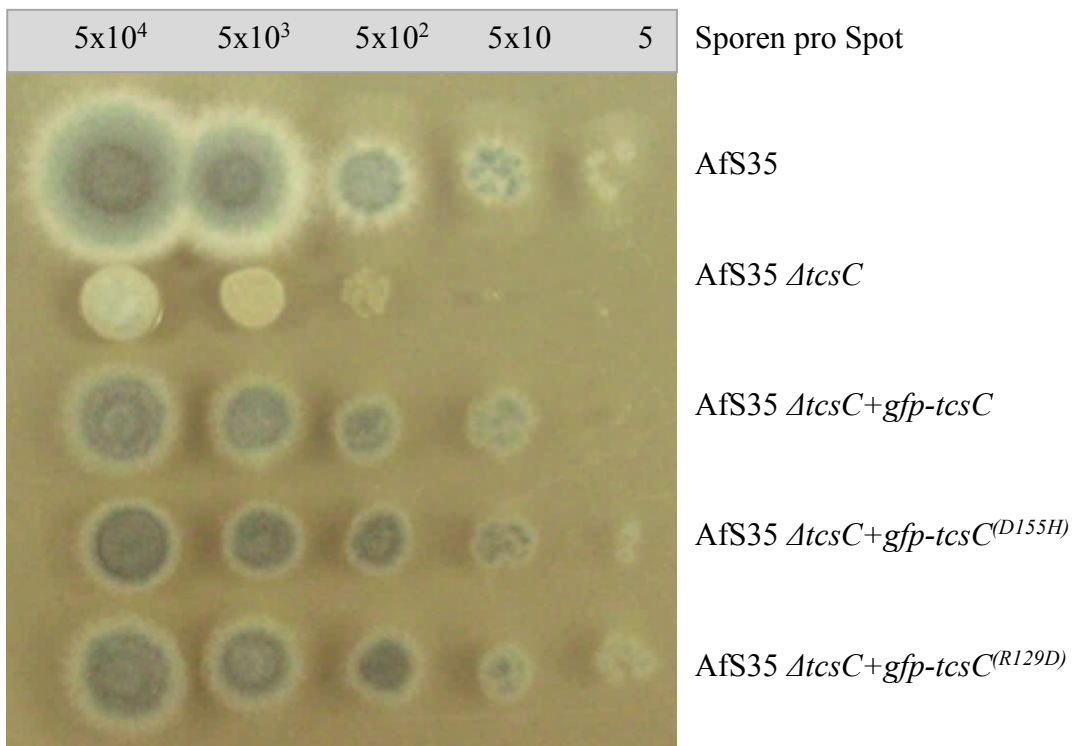
1: Bright Field (Single Plane)

2: GFP (Maximum Intensity Projection)

Der Stamm AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  wurde hinsichtlich seiner Reaktion auf den Stressor Fludioxonil sowie seiner Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress vergleichend mit dem Stamm AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  untersucht. Diese Untersuchung erfolgte in Form von Tüpfeltests unter Fludioxonil- und Sorbitol-Stress. Als Referenzstamm mit Sensibilität gegenüber Fludioxonil und uneingeschränkter Anpassungsfähigkeit an Hyperosmolarität wurde der Wildstamm AfS35 verwendet. Zusätzlich kamen die Stämme AfS35  $\Delta tcsC$  und

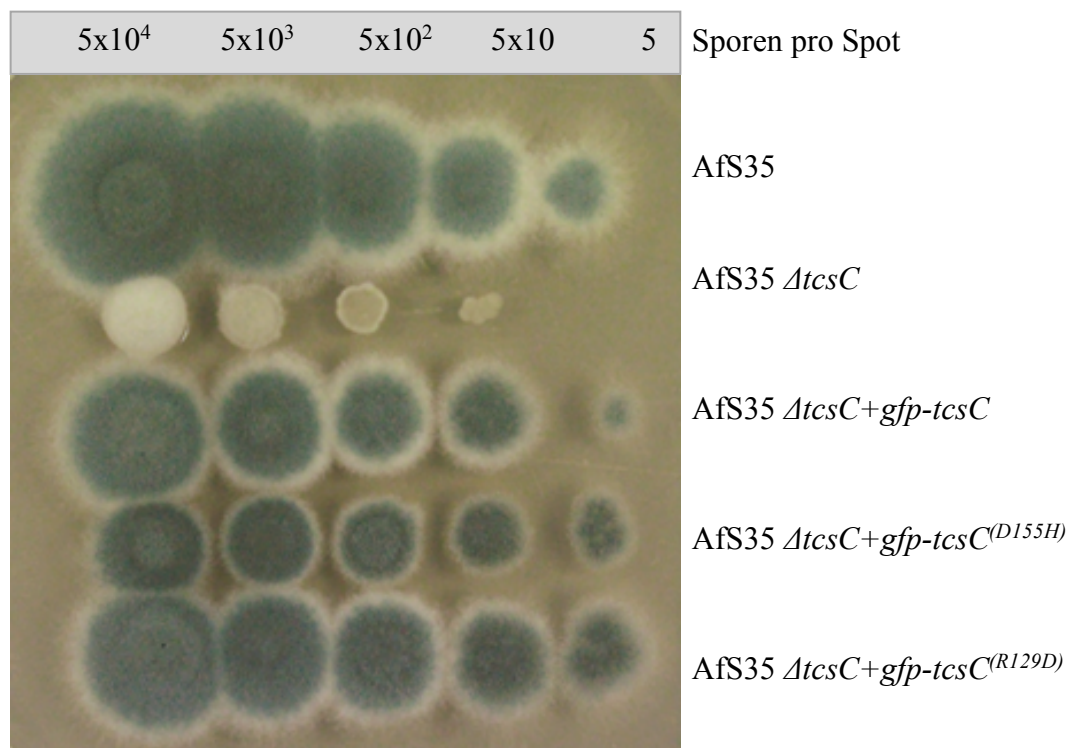


AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* zum Einsatz. AfS35  $\Delta tcsC$  stellte einen Stamm mit Fludioxonil-Resistenz und Anfälligkeit gegenüber hyperosmolarem Stress dar. AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* würde in seiner Fludioxonil-Sensibilität und Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress den zu untersuchenden Stämmen AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(R129D)</sup> und AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(D155H)</sup> gleichen, sollten die Punktmutationen in TcsC keine Auswirkungen auf die Anpassungsfähigkeit an die eingesetzten Stressoren haben. Abbildungen 50 – 52 zeigen die folgend erläuterten Untersuchungsergebnisse. Es ergaben sich unter dem Einfluss von Sorbitol bei AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(D155H)</sup> im Vergleich zum Wildstamm erkennbare Unterschiede in der Koloniemorphologie. Die Kolonien des Stammes AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(D155H)</sup> waren deutlich kleiner als die des Stammes AfS35 und bildeten weniger Lufthyphen aus. Die Kolonien der Stämme AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* und AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(R129D)</sup> waren zwar auch geringgradig kompakter als die des Wildstammes, hier war jedoch der Unterschied zu AfS35 bezüglich Größe und Morphologie der Kolonien nicht so deutlich (siehe Abbildung 50). Auf die beobachtete verminderte Anpassungsfähigkeit des Stammes AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* auf hyperosmolaren Stress wird in Abschnitt 1.5. der vorliegenden Arbeit näher eingegangen. Nach einer verlängerten Inkubationszeit wurde der Stressphänotyp der Kolonien von AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(D155H)</sup> noch eindrücklicher (siehe Abbildung 51). Die  $\Delta tcsC$  Mutante konnte sich von allen Stämmen am schlechtesten an den Stressor Sorbitol anpassen. Die Kolonien wiesen keine Sporulation auf, die Morphologie war kompakt ohne Lufthyphen und in der letzten Verdünnungsstufe fand keine Koloniebildung mehr statt. Unter Fludioxonil-Einfluss konnte lediglich der Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  wachsen. AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* wies bei der ersten Verdünnungsstufe noch eine Kolonie auf, die jedoch im Vergleich zur  $\Delta tcsC$  Mutante deutlich kleiner war. Bei der zweiten Verdünnungsstufe konnte aus  $5 \times 10^4$  eingesetzten Sporen lediglich eine kleine Kolonie gebildet werden. Ab der dritten Verdünnungsstufe fand kein Wachstum mehr statt. Das gleiche Bild konnte bei dem Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(R129D)</sup> dokumentiert werden. Auch hier fand ab einer Konzentration von  $5 \times 10^2$  Sporen pro Spot keine Koloniebildung mehr statt. Bei den Stämmen AfS35 und AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC*<sup>(D155H)</sup> war unter Fludioxonil-Einfluss keinerlei Wachstum möglich.



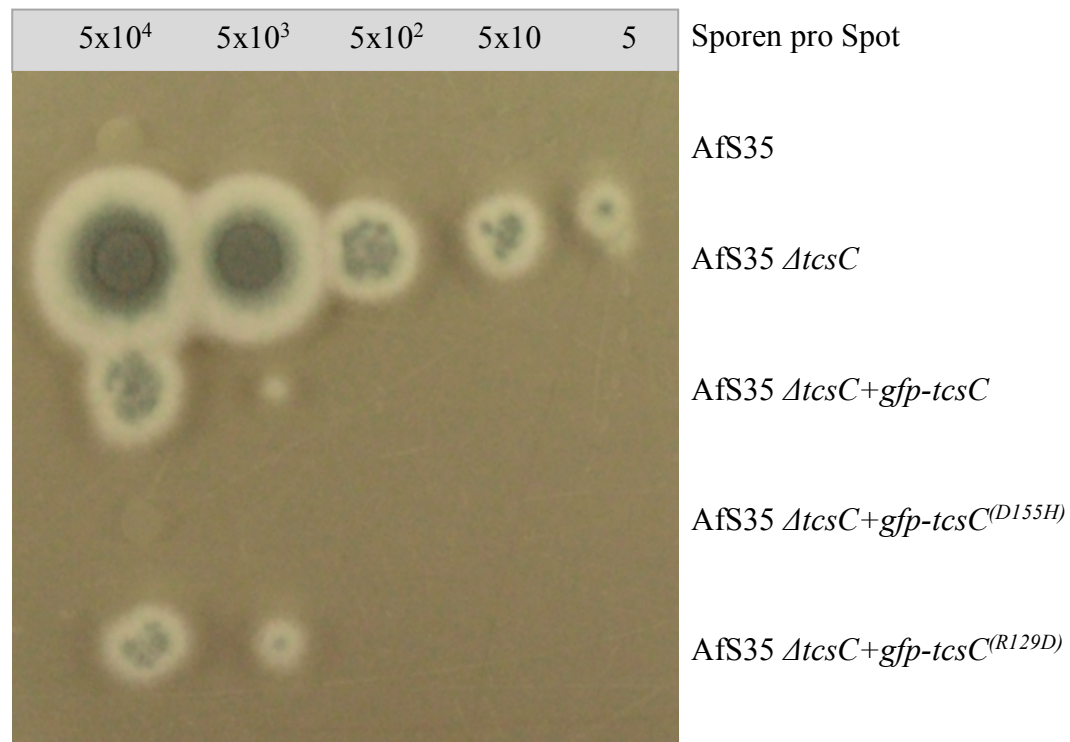
**Abbildung 50: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol**

Inkubationsdauer: 42 Stunden



**Abbildung 51: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol**

Inkubationsdauer: 48 Stunden



**Abbildung 52: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1 µg/ml Fludioxonil**

Zur Kontrolle der Koloniebildung unter physiologischen Bedingungen wurde zusätzlich ein Tüpfeltest auf AMM-Agar hergestellt (siehe Anhang Abbildung A 14). Die Koloniegröße war dabei bei allen Stämmen vergleichbar, auch wuchsen alle Verdünnungsstufen gleich an. Der Wildstamm AfS35 zeigte eine stärkere Sporulation als die Stämme AfS35  $\Delta tcsC$ , AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC$ , AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  und AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$ . Diese Stämme wiesen bei ihren Kolonien einen weißen Randsaum aus nicht sporulierenden Lufthyphen auf. Dieser Randsaum kann typischerweise bei einer  $\Delta tcsC$  Mutante und deren Komplementation beobachtet werden (MCCORMICK *et al.*, 2012).

Auf makroskopischer Ebene konnten durch die Tüpfeltests bei den Stämmen AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  und AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  Unterschiede in der Anpassung an hyperosmolaren Stress festgestellt werden. Um diese unterschiedliche Anpassungsfähigkeit auf der Ebene einzelner Hyphen näher zu studieren, wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen beider Pilze durchgeführt. Abbildungen 53 – 55 zeigen die folgend geschilderten Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Die Stämme AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  und AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  wurden jeweils mit 1,2 M Sorbitol versetzt und die Anpassungsreaktion in den Hyphen fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Bei

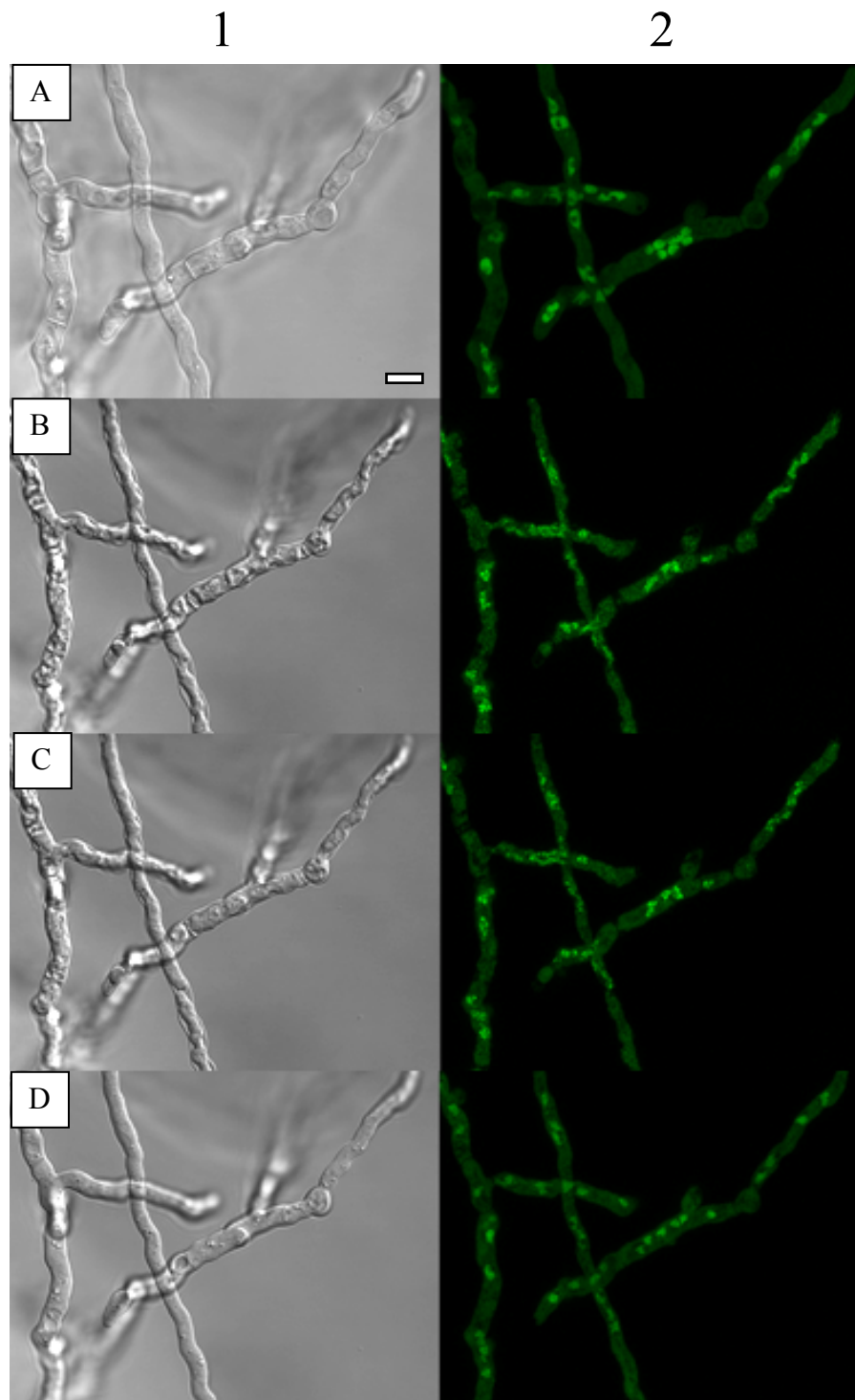
der Untersuchung diene AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC$  als Referenzstamm, der die Lokalisation eines unmanipulierten TcsC-Moleküls unter hyperosmolarem Stress abbildete. GFP-TcsC war vor Zugabe von Sorbitol im Zellkern lokalisiert. Das Fusionsprotein veränderte unter hyperosmolarem Stress seine Lokalisation, wie bereits in Abschnitt 1.3.5. bei den Untersuchungen des Stammes AfS35  $gfp-tcsC$  beobachtet, durch eine Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Die distinkte Lokalisation im Zellkern war durch den hyperosmolaren Stress einer schlecht abgrenzbaren Fluoreszenzmarkierung in der Zellkernperipherie des Zytoplasmas gewichen. Diese Lokalisation war jedoch nur transient, nach 70 Minuten Hyperosmolarität konnte das Fluoreszenzsignal in AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC$  wieder den Zellkernen zugeordnet werden (siehe Abbildung 53).

Bei dem Stamm AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  fand ebenfalls innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe von Sorbitol eine Translokation des Fusionsproteins GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> aus dem Zellkern in das Zytoplasma statt. Die klare Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne unbehandelter Hyphen war in eine schlecht abgrenzbare Fluoreszenzmarkierung im Umkreis der Zellkerne übergegangen. Im Unterschied zu GFP-TcsC markierte GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> nach 70 Minuten Hyperosmolarität eine große Anzahl distinkter, punktförmiger Strukturen unterschiedlicher Größe im Zytoplasma der Hyphen, die unregelmäßig verteilt vorlagen und vereinzelt mit dem Zellkern assoziiert zu sein schienen. GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> vollzog im Gegensatz zu GFP-TcsC keine Translokation zurück in den Zellkern (siehe Abbildung 54).

Das Fusionsprotein GFP-TcsC<sup>(R129D)</sup> liegt aufgrund seiner Mutation an Position TcsC<sub>129</sub> unter physiologischen Bedingungen im Zytoplasma und nicht im Zellkern vor. Auch unter hyperosmolarem Stress veränderte sich diese Lokalisation kaum. Nach 70 Minuten Sorbitol-Einfluss lag das Fusionsprotein GFP-TcsC<sup>(R129D)</sup> größtenteils gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor. Es konnten jedoch zudem wie bei AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  einzelne distinkte, punktförmige Fluoreszenzmarkierungen dokumentiert werden, die allerdings im Vergleich deutlich kleiner und seltener waren (siehe Abbildung 55). Wie bereits zuvor erläutert, ist im Zuge der vorliegenden Arbeit keine Zellkernfärbung bei vitalen Zellen gelungen. Demnach konnten die Zellkerne der Hyphen während der geschilderten Studien nicht dargestellt und die punktförmigen

Fluoreszenzmarkierungen der Fusionsproteine GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> und GFP-TcsC<sup>(R129D)</sup> nicht mit der Lage der Zellkerne in Verbindung gebracht werden.

Im Hinblick auf den Phänotyp der Hyphen konnte bei allen drei eingesetzten Stämmen direkt nach der Zugabe von Sorbitol ein starkes Schrumpfen des zytoplasmatischen Raumes beobachtet werden, wobei teilweise ein deutlicher Abstand zwischen Zellmembran und Zellwand entstand. Diese Volumenreduktion im Zytoplasma war transient und nach ca. einer Stunde hyperosmolarer Bedingungen nicht mehr zu dokumentieren. Auf diese Beobachtungen und dahingehende Folgeuntersuchungen wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen (siehe Abschnitt 1.5.).



**Abbildung 53: AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC* unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

A: ohne Sorbitol-Zugabe

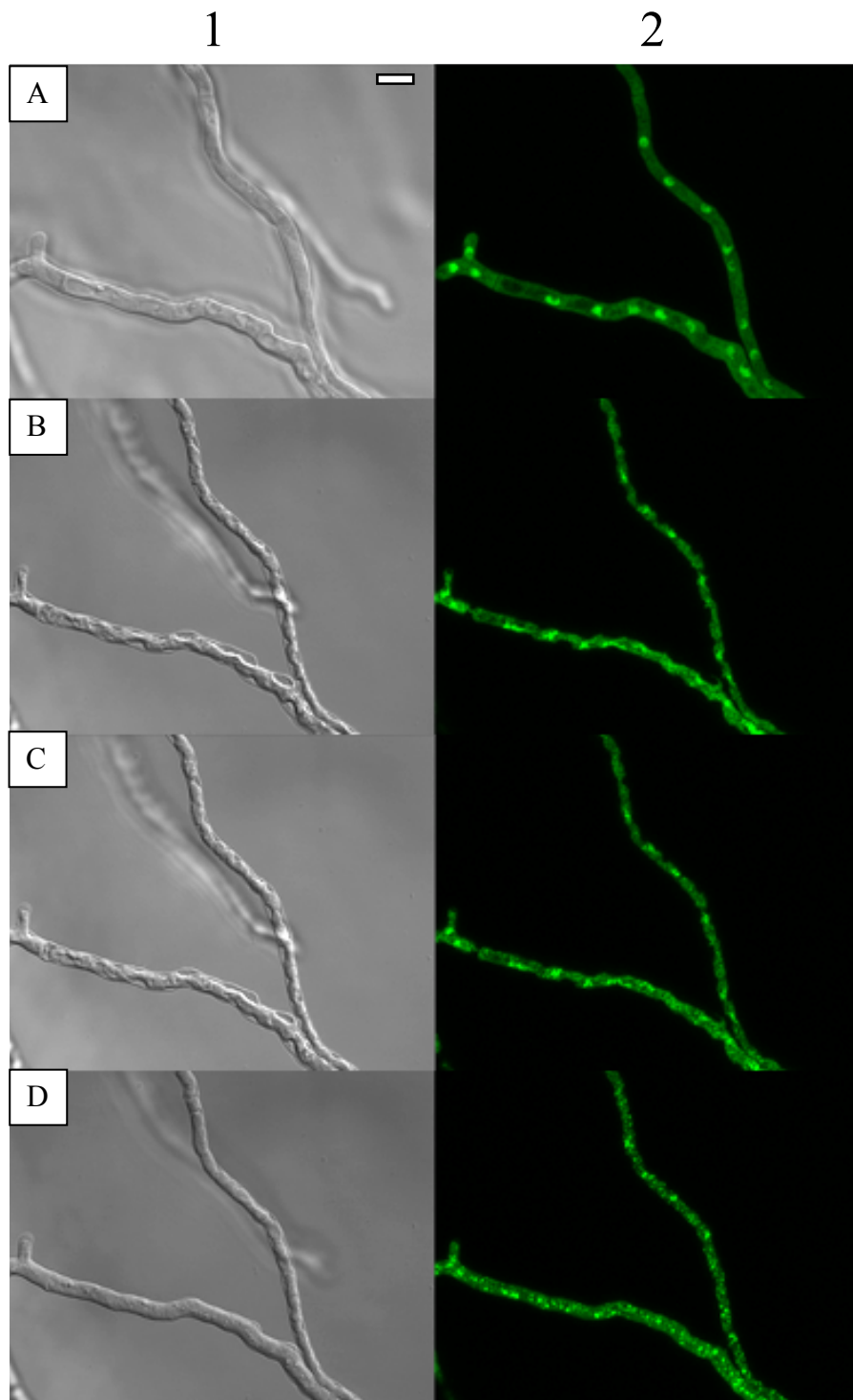
B: 10 min nach Sorbitol-Zugabe

C: 30 min nach Sorbitol-Zugabe

D: 70 min nach Sorbitol-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



**Abbildung 54:** AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(D155H)}$  unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

A: ohne Sorbitol-Zugabe

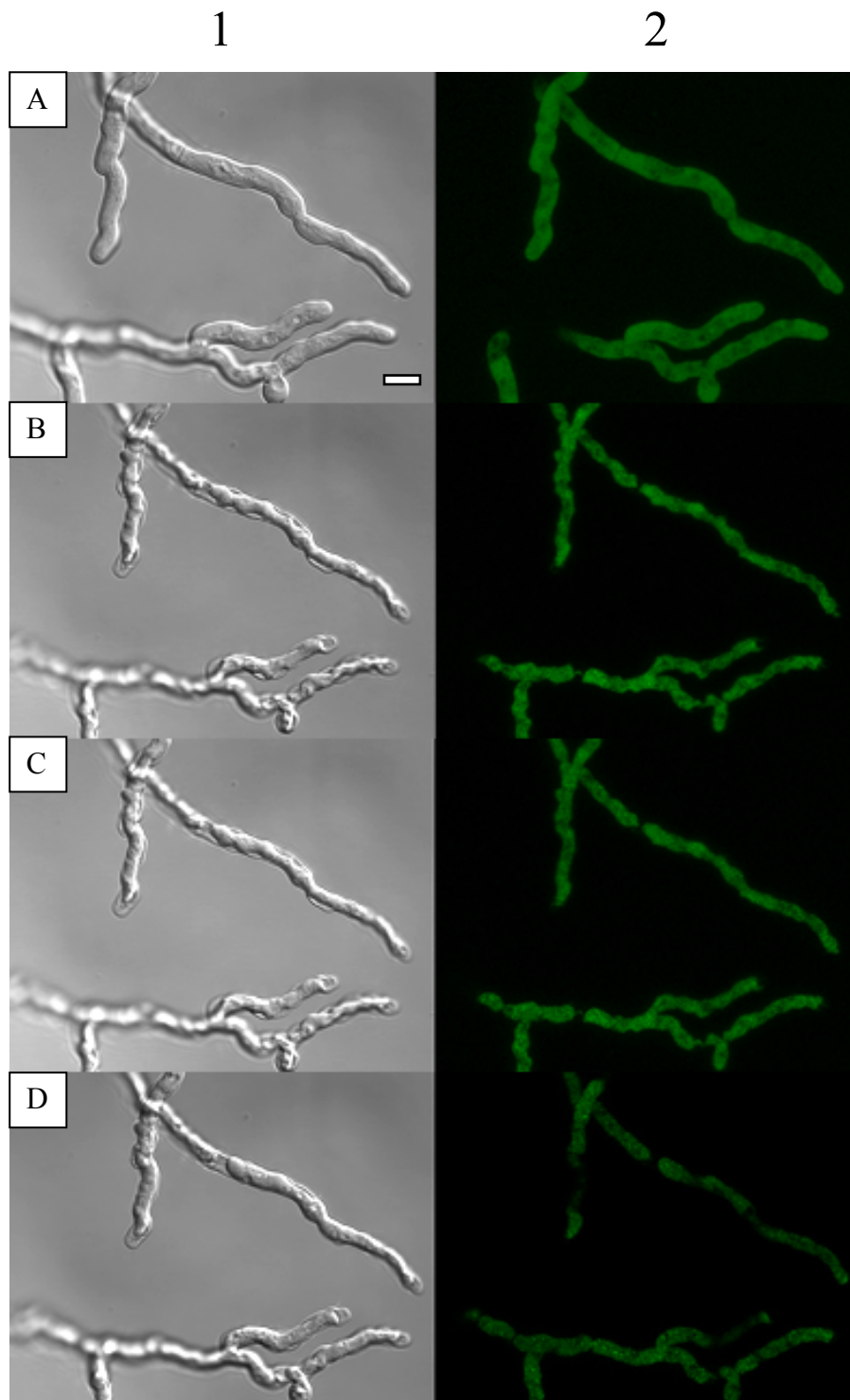
B: 10 min nach Sorbitol-Zugabe

C: 30 min nach Sorbitol-Zugabe

D: 70 min nach Sorbitol-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



**Abbildung 55:** *AfS35 ΔtcsC + gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup>* unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

A: ohne Sorbitol-Zugabe

B: 10 min nach Sorbitol-Zugabe

C: 30 min nach Sorbitol-Zugabe

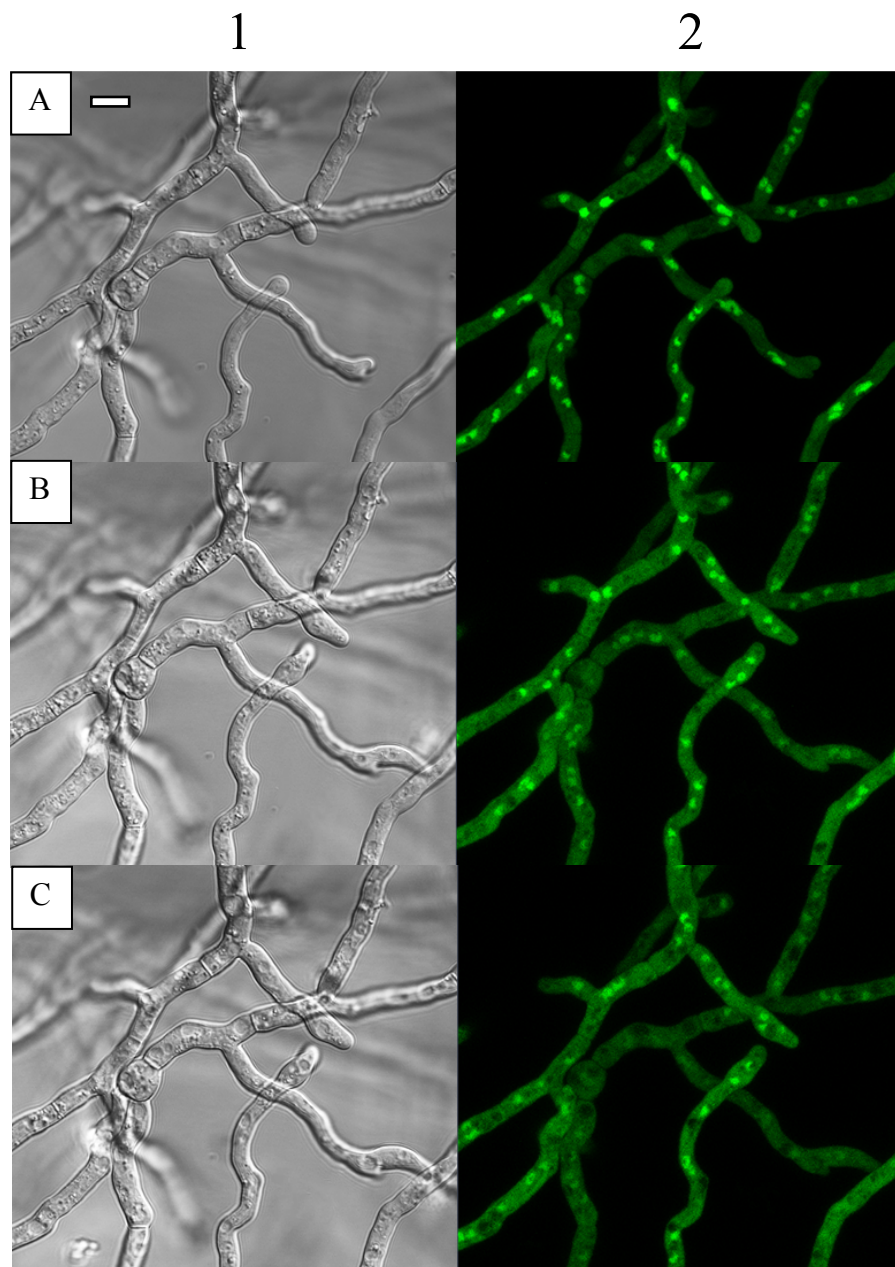
D: 70 min nach Sorbitol-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



Im Zuge der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Stammes AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  wurden neben der zuvor geschilderten Sorbitol-Studie zudem eine Studie unter Stress durch Fludioxonil durchgeführt. Es konnte hierbei interessanterweise festgestellt werden, dass die Substitution der Aminosäure TcsC<sub>155</sub> die Fähigkeit des TcsC-Moleküls einschränkte, unter dem Einfluss des Stressors aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu translozieren (siehe Abbildung 56).



**Abbildung 56: AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC*<sup>(D155H)</sup> unter Zugabe von 1µg/ml Fludioxonil**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

A: ohne Fludioxonil-Zugabe

B: 80 min nach Fludioxonil-Zugabe

C: 120 min nach Fludioxonil-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

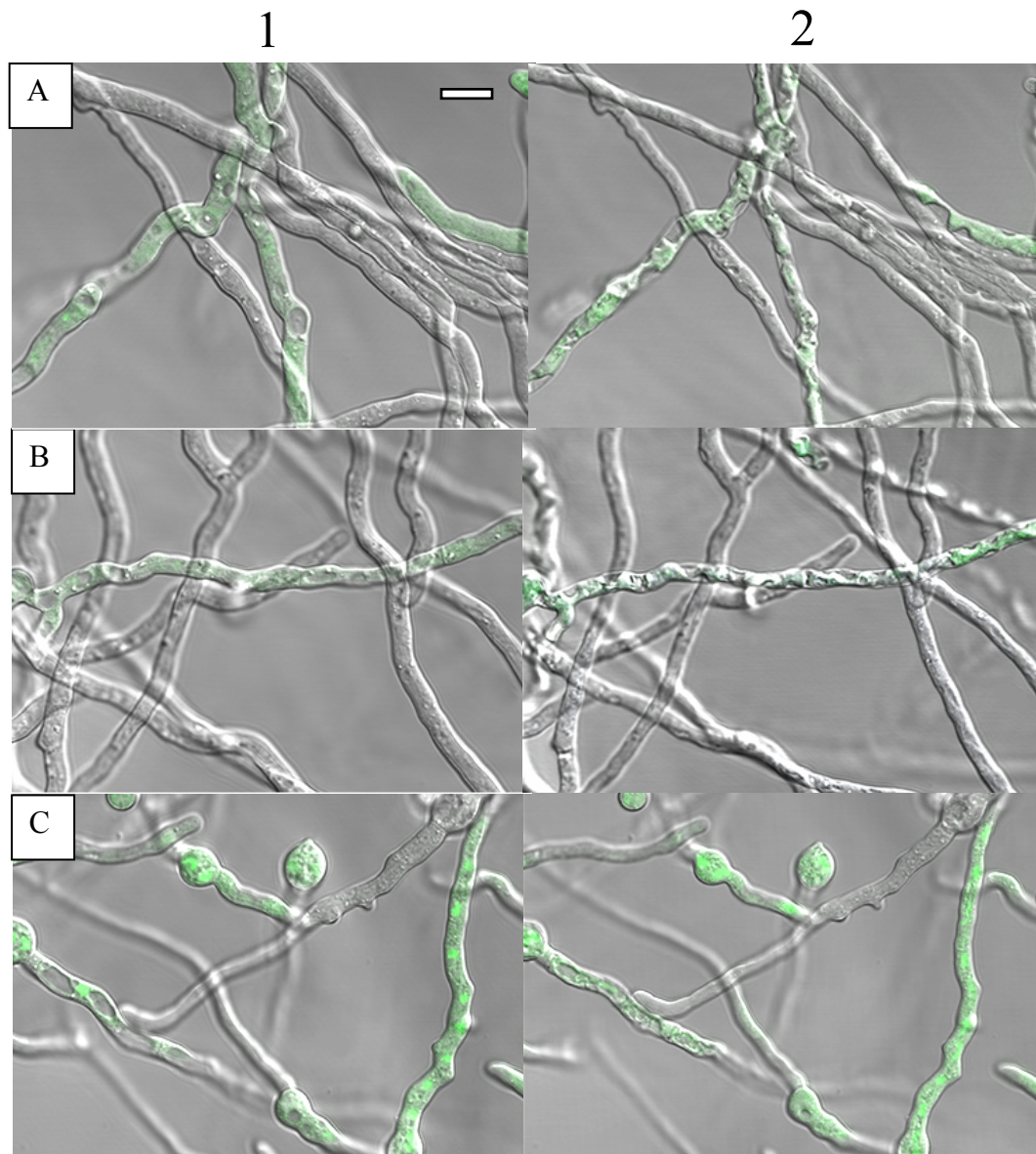
### 1.5. Untersuchung der Aktivität eines nativen TcsC-Moleküls bei Überexpression transformierter Proteine

Der Studienaufbau der zuvor geschilderten Untersuchungen basierte auf der Annahme, dass die Expression eines GFP-TcsC-Fusionsproteins keine Auswirkungen auf die physiologische Aktivität des nativen TcsC-Moleküls hat. Bisherige Arbeiten ergaben diesbezüglich keinen Hinweis. Es wurde allerdings zu einem späten Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit ein negativer Einfluss des GFP-TcsC-Fusionsproteins auf die Anpassungsfähigkeit des exprimierenden Organismus an hyperosmolaren Stress erkannt. Beobachtet wurde diese verminderte Reaktionsfähigkeit auf Hyperosmolarität im Zuge einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Stammes AfS35 *gfp-tcsC* durch ein massives Schrumpfen des Zytoplasmas nach Zugabe von Sorbitol. Das für das Fusionsprotein GFP-TcsC codierende Gen wurde über den Vektor pSK379 in das Genom von AfS35 integriert. Dieses Plasmid beinhaltet einen *gpdA*-Promoter mit hoher Expressionsrate (siehe Anhang Abbildung A 2), wodurch GFP-TcsC in dem transformierten Stamm überexprimiert vorliegt. Um festzustellen, ob die beobachtete verminderte Anpassungsfähigkeit eines Stammes mit einer durch pSK379 hervorgerufenen Überexpression von GFP-TcsC in Zusammenhang steht, wurden die nachfolgend erläuterten Studien durchgeführt.

Vorerst wurde ein Referenzstamm mit der Bezeichnung AfS35 *gfp-tcsC<sup>natPro</sup>* hergestellt. Dieser Stamm exprimierte das Fusionsprotein GFP-TcsC nicht über den in pSK379 enthaltenen *gpdA*-Promoter, sondern über den nativen Promoter von *tcsC*, welcher deutlich schwächer ist (persönliche Mitteilung von Prof. Frank Ebel). Dadurch konnte der Einfluss des Fusionsproteins GFP-TcsC auf die Anpassungsfähigkeit des Stammes an hyperosmolaren Stress bei physiologischer Expressionsrate dokumentiert werden. Die Sequenz des nativen *tcsC*-Promoters wurde über die *Aspergillus Genome Database* (AspGD) ermittelt, seine genetische Information war in 1000 Basenpaaren *upstream* von *tcsC* enthalten. Der 1 kB lange DNS-Abschnitt wurde per PCR aus DNS von AfS35 amplifiziert. Die gewonnene DNS-Sequenz wurde im Anschluss über eine PmeI-Schnittstelle zwischen dem *gpdA*-Promoter und der *gfp-tcsC*-Sequenz in das Plasmid pSK379 *gfp-tcsC* integriert. Das Konstrukt wurde in AfS35 transformiert und der generierte Stamm als AfS35 *gfp-tcsC<sup>natPro</sup>* bezeichnet. Der neu generierte Stamm wurde in einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit AfS35 *gfp-tcsC*, dem

Wildstamm AfS35 sowie AfS35 *ΔtcsC* + *gpf-tcsC* verglichen. Hierfür wurde je eine Mischkultur aus AfS35 sowie einem der zu untersuchenden Stämme in AMM-Flüssigmedium angezogen und die Mischkultur unter fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung hyperosmolarem Stress ausgesetzt. AfS35 konnte dabei durch das Fehlen eines Fluoreszenzsignals von dem zu untersuchenden Stamm unterschieden werden. Eine verminderte Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress äußerte sich bei den untersuchten Hyphen durch ein deutliches Schrumpfen des zytoplasmatischen Raumes, wobei sich der Abstand zwischen Zellmembran und Zellwand vergrößerte. Die Hyphen des Wildstammes AfS35 zeigten unter Sorbitol-Einfluss keine darstellbaren Veränderungen. AfS35 diente somit als Referenz einer physiologischen Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress.

Abbildung 57 stellt die nachfolgend erläuterten Untersuchungsergebnisse dar. Es konnten zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen herausgearbeitet werden. Der Stamm AfS35 *gfp-tcsC<sup>natPro</sup>* hatte wie der Wildstamm keine Schwierigkeiten bei der Anpassungsfähigkeit an den durch den Zusatz von Sorbitol ausgeübten hyperosmolaren Stress. Nicht so die Stämme AfS35 *ΔtcsC* + *gpf-tcsC* und AfS35 *gpf-tcsC*. Bei beiden Stämmen konnte eine verminderte Anpassungsfähigkeit an die hyperosmolaren Bedingungen dokumentiert werden. Der Stressphänotyp war allerdings bei beiden Stämmen transient. Die Hyphen zeigten direkt nach Zugabe von Sorbitol ein deutliches Zusammenschrumpfen des zytoplasmatischen Raumes, konnten sich jedoch innerhalb von 60 Minuten erholen und in ihren physiologischen Zustand zurückkehren.



**Abbildung 57: Studie von Mischkulturen bezüglich ihrer Anpassungsfähigkeit an hyperosmolare Bedingungen**

Overlay-Aufnahmen in Life Cell Imaging-Kammer an konfokalem Mikroskop

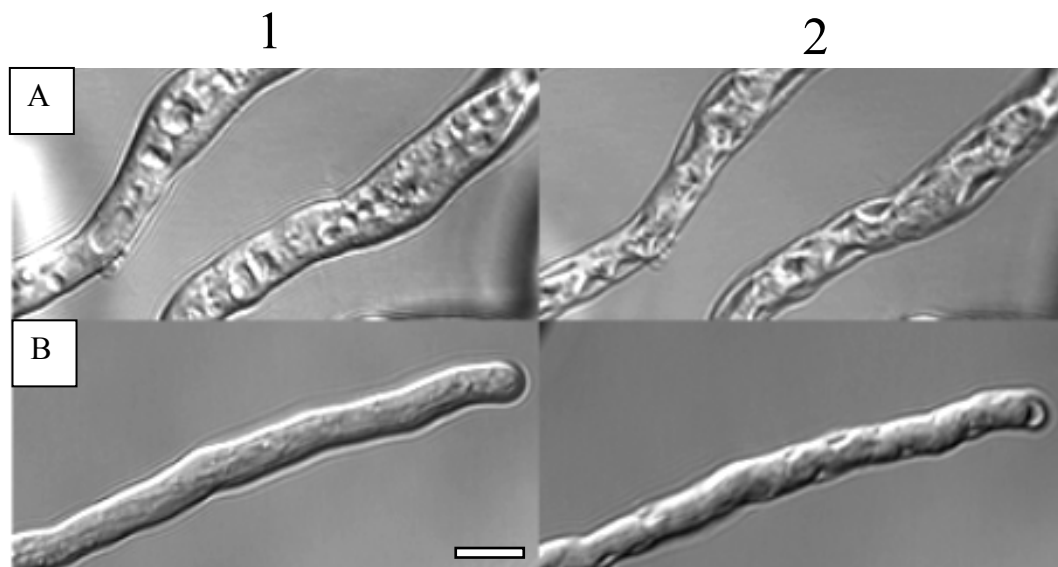
Maßstab: 5 µm

- 1: Flüssigmedium ohne Stressor
- 2: Flüssigmedium mit 1,2 M Sorbitol, Aufnahme 2 min nach Sorbitol-Zugabe
- A: AfS35 *gfp-tcsC* (grüne Fluoreszenz) und AfS35 (keine Fluoreszenz)
- B: AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC* (grüne Fluoreszenz) und AfS35 (keine Fluoreszenz)
- C: AfS35 *gfp-tcsC<sup>natPro</sup>* (grüne Fluoreszenz) und AfS35 (keine Fluoreszenz)

Diese Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass speziell die Überexpression des Fusionsproteins GFP-TcsC die Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress für einen Zeitraum von ca. einer Stunde minderte. Zu bemerken war hierbei zudem, dass die verminderte Anpassungsfähigkeit an Hyperosmolarität durch die Überexpression von GFP-TcsC sowohl bei einer Expression des Fusionsproteins

im Wildtyp AfS35 als auch in der *AtcsC* Mutante zu beobachten war. Um die beobachteten Anpassungsschwierigkeiten besser einordnen zu können, wurde als Nächstes eine Sorbitol-Studie mit dem Stamm AfS35 *AtcsC* durchgeführt und die Anpassungsreaktion mikroskopisch dokumentiert. Dieser Stamm exprimiert durch die Deletion des *tcsC*-Gens kein natives TcsC mehr.

Die Hyphen der *AtcsC* Mutante waren bereits unter physiologischen Bedingungen morphologisch uneinheitlich. Viele Hyphen zeigten eine für *A. fumigatus* typische Wuchsform mit langen, schlanken Hyphen (siehe Abbildung 58, 1B). Einige Hyphen waren jedoch apikal stark abgerundet und teils unregelmäßig verdickt (siehe Abbildung 58, 1A). Die Hyphen verhielten sich auch nach Sorbitol-Zugabe nicht einheitlich. Zum Teil konnte der bei GFP-TcsC-Überexpression beobachtete Stressphänotyp auch in der *AtcsC* Mutante beobachtet werden (siehe Abbildung 58, A). Es gab allerdings auch Hyphen, die diesen Stressphänotyp in nur sehr schwacher Ausprägung zeigten (siehe Abbildung 58, B)



**Abbildung 58: AfS35 *AtcsC* unter Zugabe von 1,2 M Sorbitol**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop, *Bright Field (Single Plane)*

Maßstab: 5 µm

1: ohne Sorbitol-Zugabe

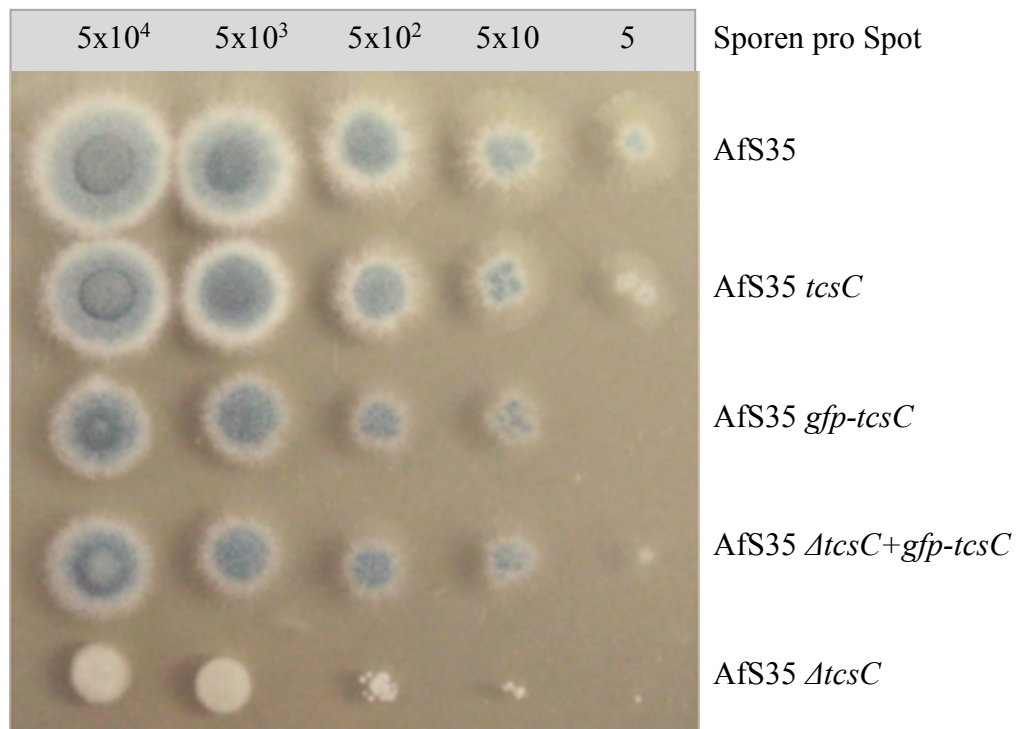
2: 2 min nach Sorbitol-Zugabe

A: Hyphen mit stark ausgeprägtem Stressphänotyp

B: Hyphen mit schwach ausgeprägtem Stressphänotyp

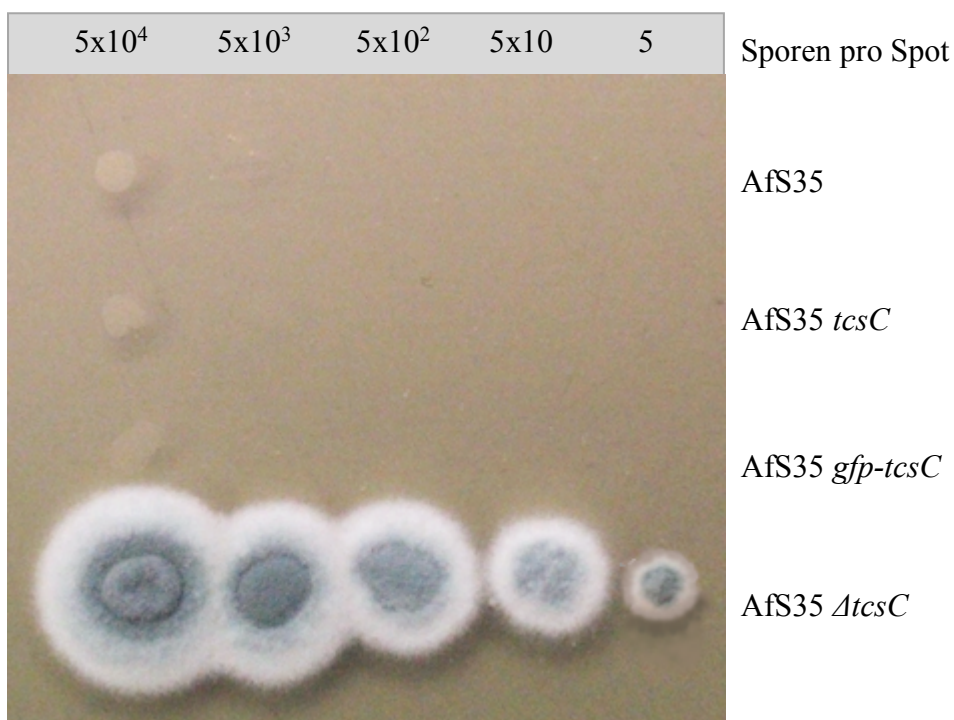
Da dieser auffällige Stressphänotyp lediglich innerhalb einer Stunde nach Einsetzen des hyperosmolaren Stress beobachtet werden konnte, sollte im Anschluss an die erläuterten mikroskopischen Untersuchungen eine Studie folgen, die den makroskopischen Phänotyp der Pilzstämmen bei Hyperosmolarität dokumentiert. Es war hierbei von Interesse, ob die transiente Schwäche der Pilzstämmen in der Anpassungsfähigkeit an den Stressor Sorbitol Auswirkungen auf das Wachstum der Hyphen haben würde. Der Wildstamm AfS35 wurde in Hinblick auf seine Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress mit den Stämmen AfS35 *tcsC*, AfS35 *gfp-tcsC* und AfS35  $\Delta tscC + gfp-tcsC$  verglichen. In AfS35 *tcsC* liegt sowohl das native TcsC als auch ein über einen *gpdA*-Promoter überexprimiertes TcsC-Protein vor. Dieser Stamm wurde in die Untersuchung inkludiert, um einen möglichen Einfluss des GFP-Moleküls auf die Anpassungsreaktion herauszuarbeiten. Die Untersuchung fand in Form eines Tüpfeltests auf mit Sorbitol versetztem Nähragar statt. Falls die Überexpression der Proteine TcsC und GFP-TcsC einen Einfluss auf das native TcsC ausübte, so wäre die Sensibilität der Stämme AfS35 *tcsC* und AfS35 *gfp-tcsC* gegenüber dem Stressor verändert. Beeinträchtigte GFP die Aktivität von TcsC innerhalb des Fusionsproteins, so wäre das Wachstum von AfS35  $\Delta tscC + gfp-tcsC$  vermindert. Als Referenzen wurden der Wildtyp AfS35 sowie die  $\Delta tscC$  Mutante eingesetzt. AfS35  $\Delta tscC$  veranschaulichte das Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen ohne den Einfluss von TcsC. Abbildung 59 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Die Stämme AfS35 und AfS35 *tcsC* waren in der Koloniebildung vergleichbar. Beide Stämme sporulierten, bildeten einen Kranz aus Lufthyphen aus und waren in der Größe der Kolonien in etwa identisch. Die Stämme AfS35 *gfp-tcsC* und AfS35  $\Delta tscC + gfp-tcsC$  zeigten beide eine im Vergleich zum Wildstamm etwas geringere Koloniegröße, waren jedoch sonst morphologisch unauffällig. Die  $\Delta tscC$  Mutante bildete nur in den ersten beiden Verdünnungsstufen größere Kolonien aus. Diese waren kompakt, klar abgegrenzt, ohne Bildung von Lufthyphen und ohne Sporulation. Das Wachstum der untersuchten Pilzstämmen ohne den Einfluss des Stressors Sorbitol ist im Anhang in Abbildung A 15 dokumentiert. Dort unterschieden sich die Stämme AfS35 *gfp-tcsC*, AfS35  $\Delta tscC + gfp-tcsC$  und AfS35  $\Delta tscC$  dahingehend von dem Wildstamm sowie von AfS35 *tcsC*, dass sie einen weißen Randsaum um die Kolonien bildeten, der aus Lufthyphen ohne Sporulation bestand. Koloniemorphologie und -größe war abgesehen davon bei allen Stämmen einheitlich.





**Abbildung 59: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1,2 M Sorbitol**

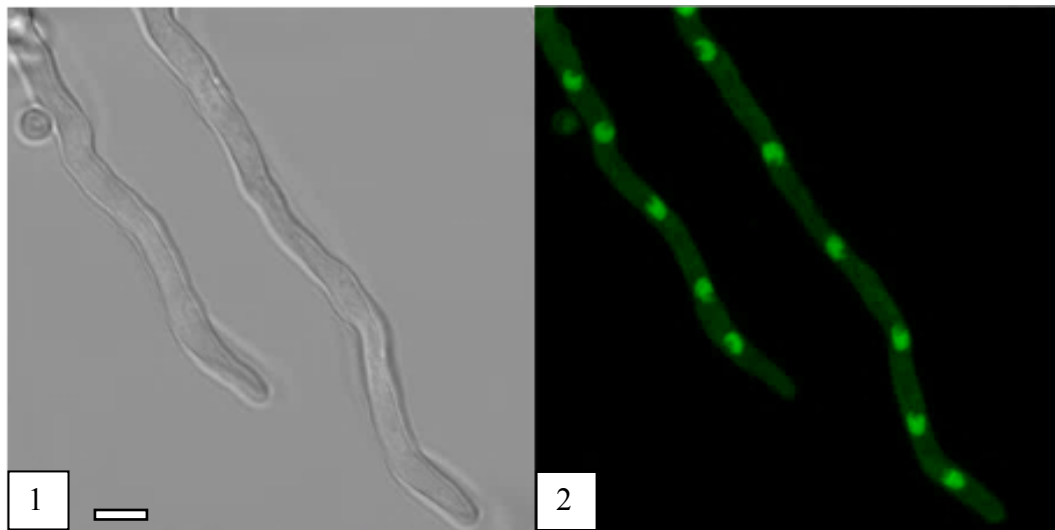
Es wurde zudem ein Tüpfeltest mit dem Stressor Fludioxonil angefertigt (siehe Abbildung 60). Außer bei der  $\Delta tcsC$  Mutante war bei keinem der eingesetzten Stämme eine Koloniebildung möglich. AfS35  $\Delta tcsC$  zeigte eine für den Stamm typische Koloniemorphologie, wo im Zentrum Sporulation auftrat und nach außen ein weißer Randsaum aus nicht sporulierenden Lufthyphen.



**Abbildung 60: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 1µg/ml Fludioxonil**



Da ein großer Teil der in dieser Arbeit verwendeten Stämme verkürzte Varianten von TcsC exprimierten, sollte die Untersuchung der durch den *gpdA*-Promoter hervorgerufenen Überexpression zudem bei einem verkürzten TcsC-Teilprotein durchgeführt werden. Diese verkürzten und inaktiven Konstrukte könnten das native TcsC-Molekül von Bindungsstellen im Zellkern verdrängen und dadurch einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins ausüben. Für die im Folgenden geschilderten Untersuchungen wurde der Stamm AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-286</sub>* erstellt, welcher ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und TcsC<sub>1-286</sub> exprimiert. TcsC<sub>1-286</sub> stellt dabei den N-terminalen Bereich von TcsC bis hin zur ersten HAMP-Domäne dar. Das Fusionsprotein GFP-TcsC<sub>1-286</sub> war in AfS35 im Zellkern lokalisiert (siehe Abbildung 61).



**Abbildung 61: AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-286</sub>***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

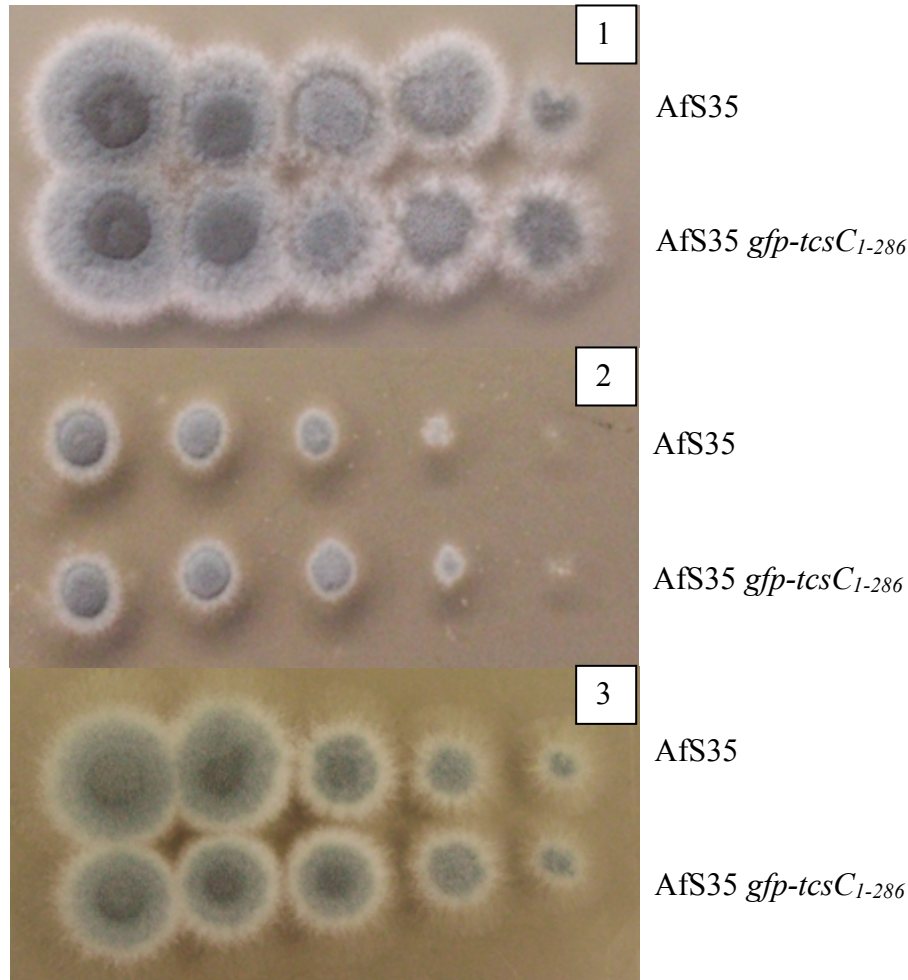
Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Es wurden mehrere Tüpfeltests zur Beurteilung des Einflusses der Überexpression des Fusionsproteins GFP-TcsC<sub>1-286</sub> auf die Anpassungsreaktionen des Stammes AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-286</sub>* angefertigt (siehe Abbildung 62). Als Referenzstamm für ein Wachstum ohne artifizielle Überexpression wurde AfS35 eingesetzt. Vorerst wurde das Wachstum der beiden Stämme unter physiologischen Bedingungen dokumentiert (siehe Abbildung 62, 1). Es ergab sich dabei kein Unterschied in der Koloniebildung. Die Kolonien wiesen eine vergleichbare Sporulation, Koloniegröße und Lufthyphenbildung auf. Des Weiteren wurde das Wachstum der Stämme unter hyperosmolarem Stress beurteilt. Hierfür wurden Tüpfeltests auf

Nähragar mit 1 M Natriumchlorid bzw. 1,2 M Sorbitol durchgeführt (siehe Abbildung 62, 2 und 3). Auch bei diesen Tests unterschieden sich die Kolonien der beiden Stämme nicht voneinander. Unter dem Einfluss von Natriumchlorid waren die Kolonien deutlich kleiner als unter dem Einfluss von Sorbitol.

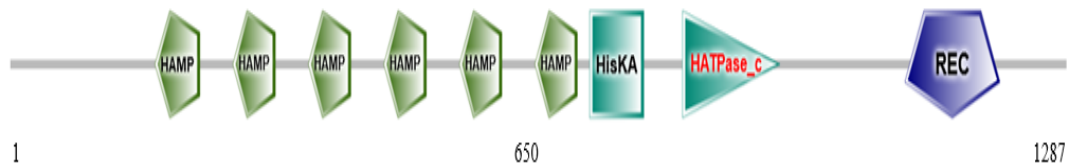


**Abbildung 62: Tüpfeltests auf AMM-Agar mit und ohne hyperosmolarem Stress**

- 1: ohne Stressor
- 2: 1 M Natriumchlorid
- 3: 1,2 M Sorbitol

#### 1.6. Untersuchung der Zielstruktur von Fludioxonil im TcsC-Molekül

Die Wirkung des Fungizids Fludioxonil beruht auf einer stetigen Aktivierung des HOG-Signalwegs. Neben einem Wachstumsstopp in den behandelten Hyphen führt Fludioxonil durch eine Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts zu einem Anschwellen der Zellen. Die Wirkungsweise von Fludioxonil ist jedoch bislang noch nicht vollständig geklärt. Als aufschlussreich erwiesen sich Studien des Proteins Drk1, der Gruppe III-HHK der Pilzspezies *Blastomyces dermatitidis*. Abbildung 63 zeigt eine schematische Darstellung von Drk1.

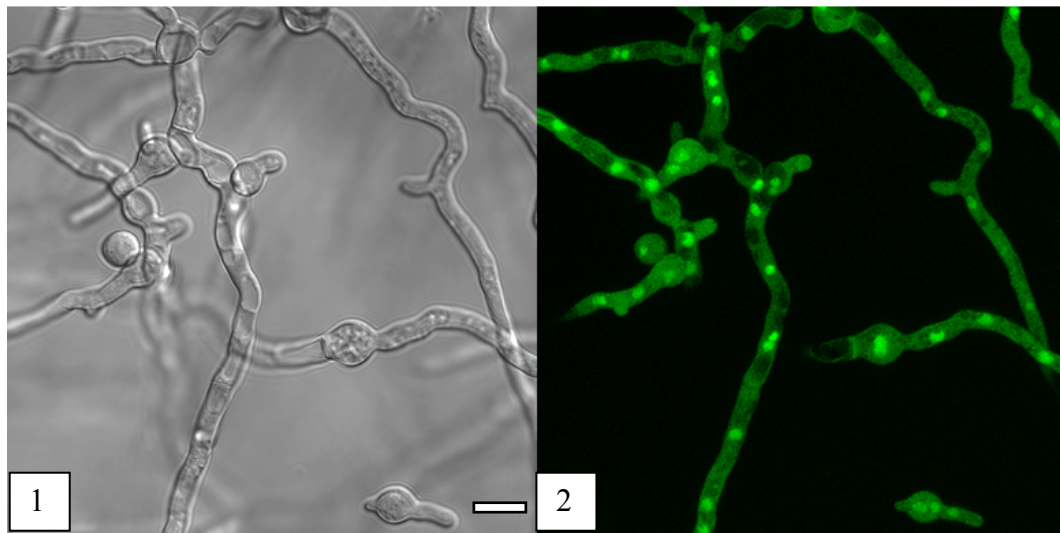


**Abbildung 63: Die Gruppe III-HHK Drk1 aus *B. dermatitidis* (Drk1<sub>1-1287</sub>)**

HAMP:	HAMP-Domäne
HisKA:	Histidin-Kinase A-Subdomäne
HATPase_c:	Histidin-Kinase-ähnliche ATPase-Subdomäne
REC:	<i>receiver</i> -Domäne

Drk1 ist für die Fludioxonil-Sensibilität der Spezies *B. dermatitidis* verantwortlich und vermag bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* eine Sensibilität der physiologisch resistenten Hefe gegenüber Fludioxonil herzustellen. Untersuchungen ergaben, dass bei Drk1 speziell die Aminosäure Drk1<sub>392</sub> und damit ein Cysteinrest essentiell für die Wirkung von Fludioxonil ist. Die Mutation C392S, eine Substitution des Cysteinrestes (C) von Drk1<sub>392</sub> in einen Serinrest (S), führte zu einer Resistenz gegenüber Fludioxonil (BRANDHORST *et al.*, 2019). Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die für Drk1 geltenden Ergebnisse auf die HHK TcsC übertragbar waren und ob eine vergleichbare Mutation in TcsC eine Fludioxonilresistenz in *A. fumigatus* hervorrufen würde.

Vorerst wurde die Proteinsequenz von Drk1 über die Website des *National Center for Biotechnology Information* ermittelt und diese im Anschluss über ein Aminosäuresequenz-Alignment mit TcsC verglichen (siehe Anhang Abbildung A 16). Hierdurch wurde die zu Drk1<sub>392</sub> äquivalente Aminosäure TcsC<sub>447</sub> ermittelt. Analog zu der Mutation Drk1<sup>(C392S)</sup> wurde der Cysteinrest von TcsC<sub>447</sub> in einen Serinrest umgewandelt. Die Mutation erfolgte durch einen Austausch des Basentriplets TGC in TCC. Das manipulierte TcsC<sup>(C447S)</sup>-Molekül wurde anschließend als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Der Stamm AfS35 *gfp-tcsC<sup>(C447S)</sup>* wies bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ein zellkernlokalisiertes Fluoreszenzsignal auf (siehe Abbildung 64).



**Abbildung 64:** AfS35 *gfp-tcsC*<sup>(C447S)</sup>

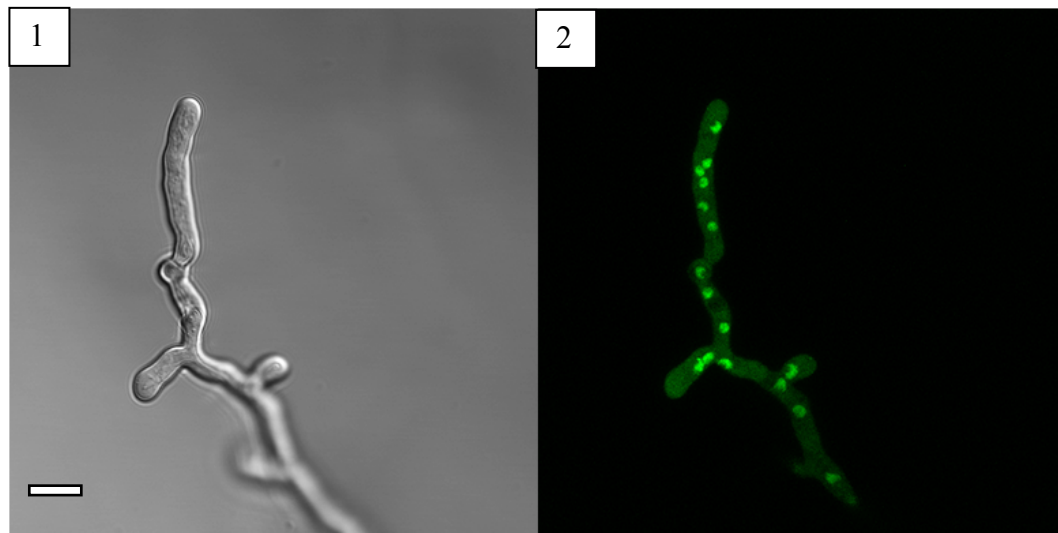
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Um die Sensibilität des Stammes gegenüber Fludioxonil testen zu können, wurde anschließend das native *tcsC*-Gen deletiert (*tcsC*-Deletion, siehe Abschnitt 1.3.2.) und der entstandene Stamm nach der in Abschnitt 1.4.4.3. für den Stamm AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(R129D)}$  erläuterten Vorgehensweise sowohl per Anzucht auf Hygromycin-Selektionsagar als auch per PCR auf die Integration der *tcsC*-Deletionskassette getestet. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Stammes ergab, dass sich die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-TcsC<sup>(C447S)</sup> im Zellkern durch die Deletion des nativen *tcsC*-Gens nicht veränderte. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass die Hyphen vereinzelt unphysiologische Verdickungen und abgerundete Enden aufwiesen (siehe Abbildung 65).



**Abbildung 65:** AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(C447S)}$

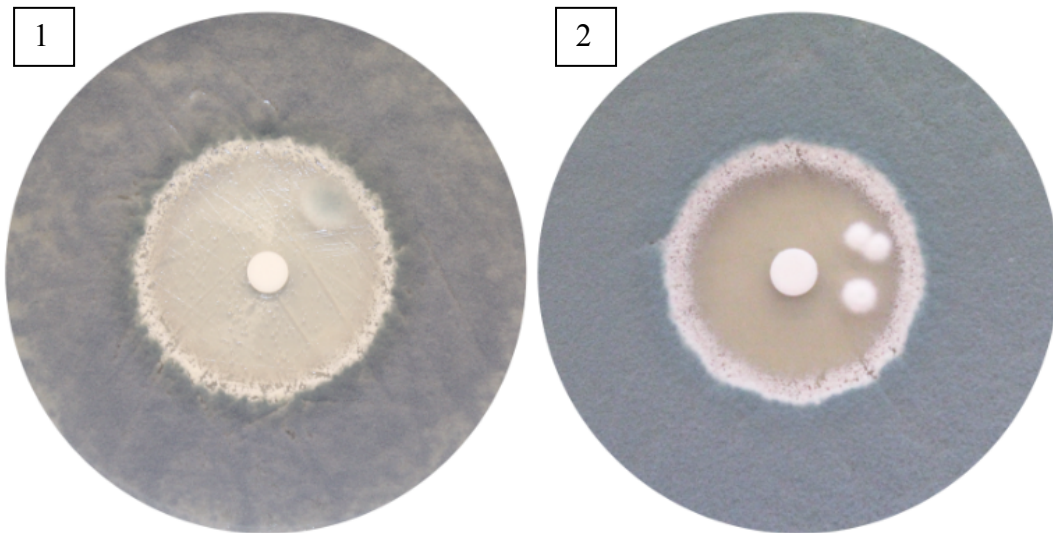
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Der Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(C447S)}$  wurde mittels eines Agardiffusionstests unter dem Einsatz von 7 µg Fludioxonil auf seine Sensibilität gegenüber dem Fungizid getestet. Als Referenz eines Fludioxonil-sensiblen Stammes wurde zusätzlich ein Agardiffusionstest mit dem Wildstamm AfS35 durchgeführt. Den von Brandhorst *et al.* (2019) publizierten Daten zufolge war durch die Mutation C392S im Drk1-Molekül eine Fludioxonil-Resistenz entstanden. Dies konnte jedoch durch die Mutation C447S in TcsC nicht reproduziert werden. Der Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(C447S)}$  zeigte im durchgeführten Agardiffusionstest keine Resistenz gegenüber Fludioxonil. Wie in Abbildung 66 ersichtlich, bildete sich bei AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(C447S)}$  ein Hemmhof aus, der in seiner Größe dem des Wildstammes AfS35 entsprach. Bei beiden Stämmen konnten innerhalb des Hemmhofes vereinzelt Kolonien spontanresistenter Klone wachsen. Um ausschließen zu können, dass der für den untersuchten Stamm AfS35  $\Delta tcsC$  +  $gfp-tcsC^{(C447S)}$  herangezogene Transformationsklon einen Einzelfall mit fehlender Fludioxonilresistenz darstellte, wurde die Sensibilität anhand drei weiterer Transformationsklone getestet. Auch bei diesen Klonen konnte keine Resistenz gegenüber Fludioxonil beobachtet werden.



**Abbildung 66: Agardiffusionstest auf AMM-Agar mit Fludioxonil (7 µg)**

- 1: AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC*<sup>(C447S)</sup>  
 2: AfS35

### 1.7. Af-Cbf5 als weiteres Beispiel eines zellkernlokalisierten Proteins

Das Protein CBF5p der Hefe *S. cerevisiae* ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, welches unter hyperosmolaren Bedingungen in das Zytoplasma transloziert (NANDURI & TARTAKOFF, 2001). Mit dieser Translokation verhält es sich ähnlich zu TcsC in *A. fumigatus*, weshalb es im Zuge der Experimente an TcsC vergleichend in die Untersuchungen eingebunden werden sollte. Über die *Aspergillus Genome Database* (AspGD) konnte das zu CBF5p homologe *A. fumigatus*-Protein als Afu5g05710 identifiziert werden. Afu5g05710 wird in dieser Arbeit als Af-Cbf5 bezeichnet. Abbildung 67 zeigt eine schematische Darstellung von Af-Cbf5.



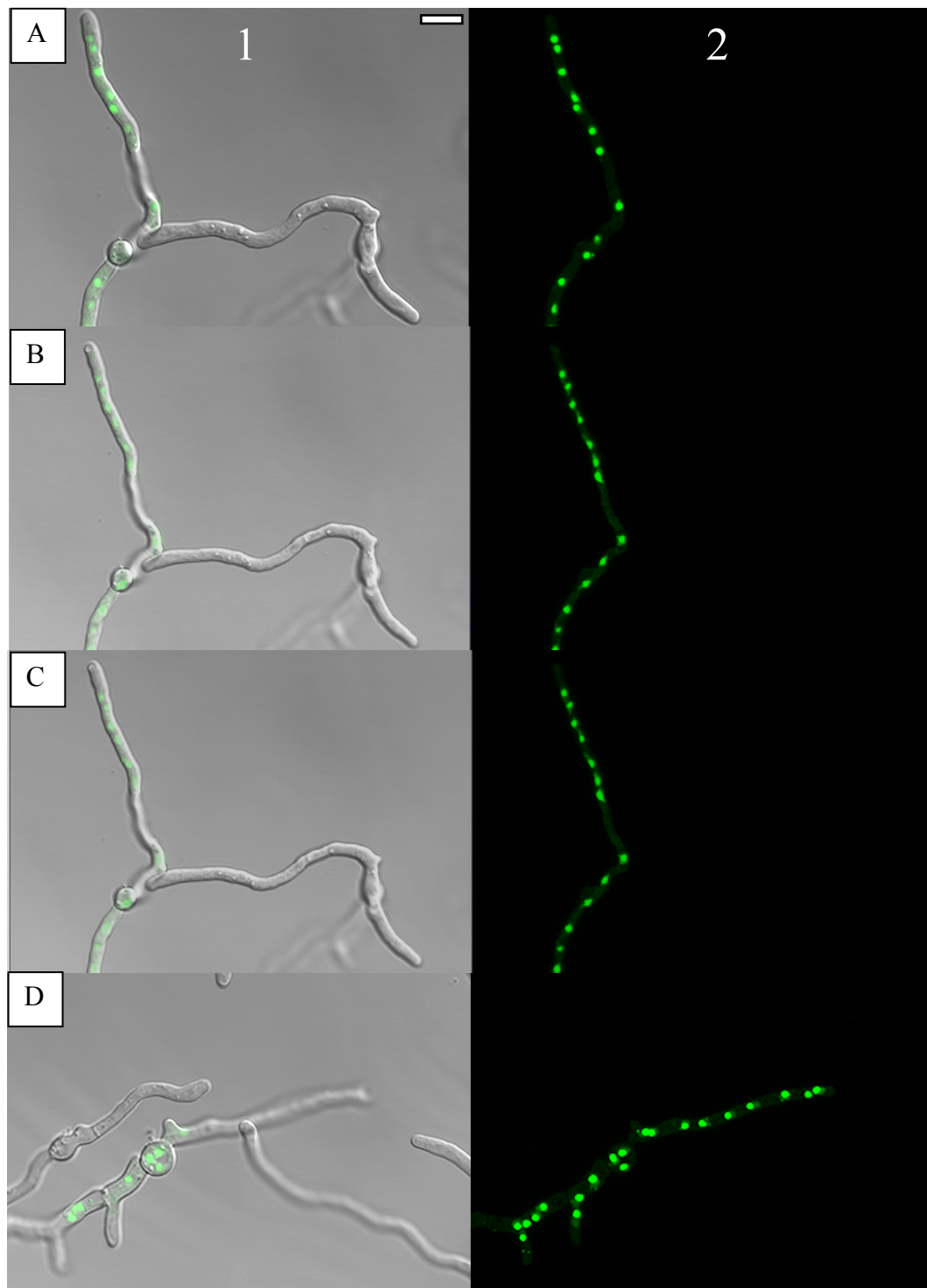
**Abbildung 67: Das Protein Af-Cbf5 aus *A. fumigatus* (Af-Cbf5<sub>1-487</sub>)**

- DKCLD: N-terminale Domäne in *dyskerin-like proteins*  
 PUA: Putative RNA-Bindungsdomäne in PseudoUridine-Synthasen und Archaeosine-Transglycosylasen  
 pink: *low complexity region*  
 grün: *coiled coil region*



In AfS35 wurde ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und Af-Cbf5 exprimiert. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Stammes AfS35 *gfp-Af-cbf5* konnte eine Zellkernlokalisation des Fusionsproteins GFP-Af-Cbf5 festgestellt werden (siehe Abbildungen 68, A und 69, A). Im Weiteren wurde untersucht, ob die Ergebnisse von Nanduri & Tartakoff (2001) von *S. cerevisiae* auf *A. fumigatus* übertragbar waren und somit auch Af-Cbf5 ein Protein darstellte, welches wie TcsC bei hyperosmolarem Stress aus dem Zellkern in das Zytoplasma auswandert. Es sollte demnach in Erfahrung gebracht werden, ob hyperosmolarer Stress die Translokation mehrerer Kernproteine bewirkt. Hierfür wurde eine Untersuchung durchgeführt, die in ihrem Aufbau mit der in Abschnitt 1.3.5. beschriebenen Sorbitol-Studie vergleichbar war. Der Stamm AfS35 *gfp-Af-cbf5* wurde über Nacht in AMM-Flüssigmedium angezogen und dem Medium am darauffolgenden Tag unter fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung 1,2 M Sorbitol zugesetzt. Dadurch konnte die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-Af-Cbf5 unter hyperosmolarem Stress analysiert werden. Es wurde festgestellt, dass im Unterschied zu den Untersuchungsergebnissen bei *S. cerevisiae* in AfS35 keine Translokation von GFP-Af-Cbf5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma stattfand (siehe Abbildung 68). Zudem war ersichtlich, dass der Stamm AfS35 *gfp-Af-cbf5* keinen, wie bei *AfS35 gfp-tcsC* (siehe Abschnitt 1.5.) beobachteten, Stressphänotyp entwickelte.

In dem es unter hyperosmolarem Stress keine Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma vollzog, unterschied sich GFP-Af-Cbf5 sowohl vom homologen Protein CBF5p aus *S. cerevisiae* als auch von GFP-TcsC. Bei GFP-TcsC konnte jedoch neben hyperosmolarem Stress auch der Einfluss von Fludioxonil eine Translokation bewirken (siehe Abschnitt 1.3.5.). Um Af-Cbf5 und TcsC besser miteinander vergleichen zu können, wurde demnach bei dem Stamm AfS35 *gfp-Af-cbf5* zusätzlich eine Studie nach zuvor geschildertem Versuchsaufbau durchgeführt, wobei hier anstatt Sorbitol der Stressor Fludioxonil eingesetzt wurde. Es konnte dokumentiert werden, dass auch unter Fludioxonil-Einfluss eine Translokation von GFP-Af-Cbf5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma ausblieb, obwohl nach 80 Minuten bereits einige Hyphen ein für die Einwirkung von Fludioxonil typisches Anschwellen zeigten (siehe Abbildung 69).



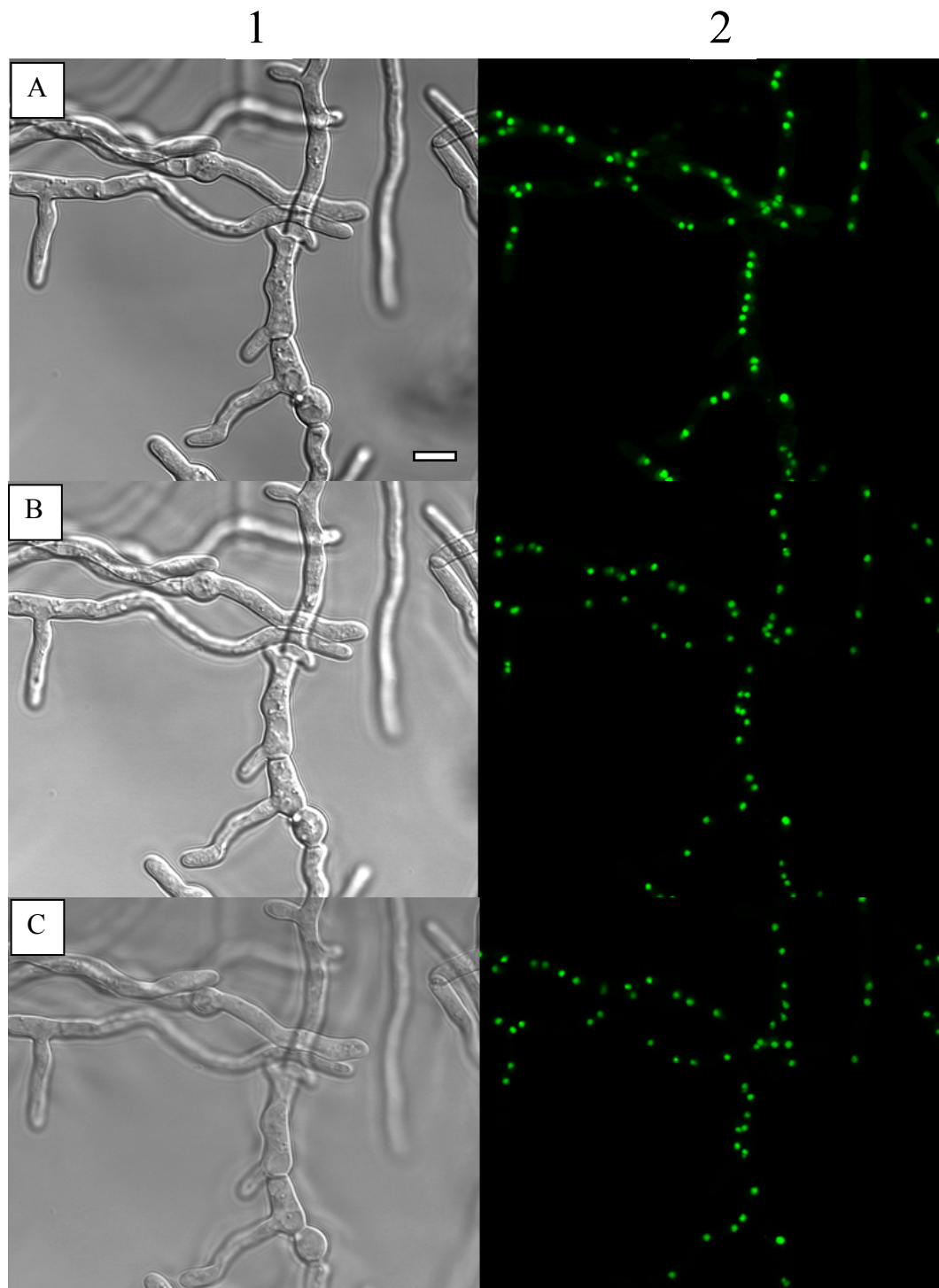
**Abbildung 68: Sorbitol-Studie einer Mischkultur aus AfS35 *gfp-Af-cbf5* (grüne Fluoreszenz) und AfS35 (keine Fluoreszenz)**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

- 1: *Bright Field (Single Plane)*
- 2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*
- A: ohne Sorbitol-Zugabe
- B: 2 min nach Sorbitol-Zugabe
- C: 10 min nach Sorbitol-Zugabe
- D: 1 h nach Sorbitol-Zugabe





**Abbildung 69: Lokalisation von GFP-Af-Cbf5 in AfS35 vor und nach Zugabe von 1 µg/ml Fludioxonil**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop. Mischkultur aus AfS35 und AfS35 *gfp-Af-cbf5*.

Maßstab: 5 µm

A: ohne Fludioxonil-Zugabe

B: 80 min nach Fludioxonil-Zugabe

C: 120 min nach Fludioxonil-Zugabe

1: *Bright Field (Single Plane)*

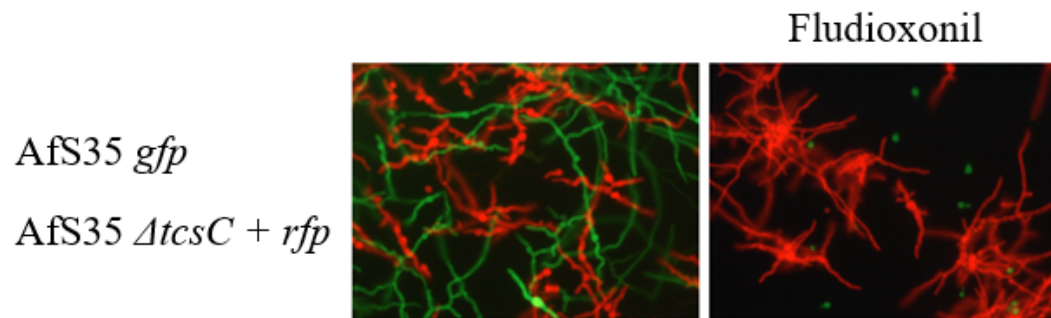
2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

### **1.8. Herstellung des Stammes A26 *AnikA* + *gfp* für den Einsatz in einem *Screening Assay* für antifungale Wirkstoffe**

Einen weiteren, von den zuvor geschilderten Untersuchungen größtenteils unabhängigen, Aspekt dieser Arbeit stellte die fortgesetzte Ausarbeitung eines von Spadinger *et al.* (2018) entwickelten *Screening Assays* für antifungale Wirkstoffe dar. Dieses *Screening Assay* wird derzeit in Kooperation mit einem industriellen Partner für die Suche neuartiger Substanzen mit Fludioxonil-ähnlicher Wirkungsweise eingesetzt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde der bislang mit *A. fumigatus* durchgeführte Test um die homologe Spezies *A. nidulans* erweitert. Hierfür wurden die Stämme A26 und A26 *AnikA* mit unterschiedlich fluoreszierenden Proteinen ausgestattet, um sie fluoreszenzmikroskopisch voneinander unterscheiden zu können. In A26 wurde das rot fluoreszierende Protein RFP exprimiert, in A26 *AnikA* das grün fluoreszierende Protein GFP. Der Vorteil des Einsatzes von *A. nidulans* im Gegensatz zu *A. fumigatus* ist, dass dieser Organismus in Laboratorien nach Sicherheitsstufe 1 des Gentechnikgesetzes verwendet werden darf. Für Laboratorien, in denen mit *A. fumigatus* gearbeitet wird, besteht dagegen die Pflicht der Durchführung von Präventivmaßnahmen nach Sicherheitsstufe 2. Das Prinzip des *Screening Assays* beruht auf der Tatsache, dass der Wildstamm A26 von *A. nidulans* gegenüber der den HOG-Signalweg aktivierenden Substanz Fludioxonil sensibel ist und unter dem Einfluss des Fungizids in seinem Wachstum gehemmt wird. Eine *AnikA* Mutante ist jedoch gegenüber Fludioxonil resistent und kann unter dem Einfluss des Fungizids unbehindert wachsen. Für das *Screening Assay* wird eine 1:1 Mischkultur aus A26 *rfp* und A26 *AnikA* + *gfp* angezogen, welche ohne Einwirkung von HOG-Signalweg aktivierenden Substanzen zu einem Hyphengeflecht mit gleichmäßig verteiltem, rot und grün fluoreszierendem Signal heranwächst. Wird das Konidiengemisch mit einem Fungizid behandelt, dessen Wirkmechanismus nicht auf einer Aktivierung des HOG-Signalwegs beruht, so werden beide Pilzstämme in ihrem Wachstum gehemmt und kein Fluoreszenzsignal ist darstellbar. Wird jedoch bei der Inkubation eine fungizide Substanz zugesetzt, deren Wirkmechanismus ähnlich zu Fludioxonil auf einer HOG-Signalwegsaktivierung beruht, so werden ausschließlich die grün fluoreszierenden Hyphen des Stammes A26 *AnikA* + *gfp* wachsen, während das rote Fluoreszenzsignal des Stammes A26 *rfp* durch die Wachstumshemmung des Pilzes ausbleibt. Mithilfe dieses *Screening Assays* können diverse Substanzen im

Hochdurchsatzverfahren auf ihre Eignung hinsichtlich eines künftigen Einsatzes als Alternative zu den bisher gängigen Fungiziden untersucht werden.

Das *Screening Assay* wurde ursprünglich für den *A. fumigatus*-Wildstamm AfS35 in Kombination mit einer *AtcsC* Mutante entwickelt. Abbildung 70 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung des *Screening Assays* mit AfS35 *gfp* und AfS35 *AtcsC* + *rfp*.



**Abbildung 70: *Screening Assay* zur Identifizierung HOG-aktivierender Substanzen mit AfS35 *gfp* und AfS35 *ΔtcsC* + *rfp***

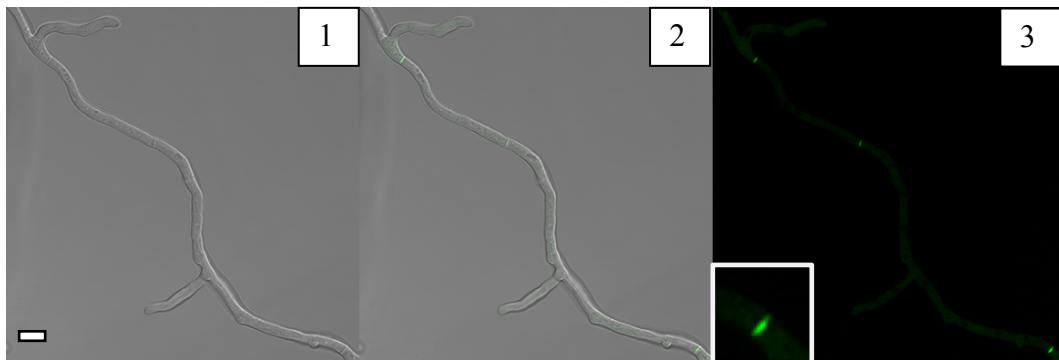
modifiziert nach (SPADINGER, 2018)

## 2. NimA-Studie

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde neben der HHK TcsC und den mit dieser Studie in Verbindung stehenden Proteinen auch mit der Ser-/Thr-spezifischen Proteinkinase NimA gearbeitet. NimA kommt sowohl in *A. nidulans* als auch in *A. fumigatus* als homologes Protein vor und ist in nicht-mitotischen Kompartimenten an den Septen der Hyphen lokalisiert (LU & MEANS, 1994; WIEDEMANN *et al.*, 2016). Mit einer Translokation von seiner Position am Septum ausgehend in Richtung Zellkernperipherie leitet NimA sowohl den Verschluss der Septumspore als auch den Beginn der Mitose im apikalen Zellkompartiment einer Hyphe ein (SHEN *et al.*, 2014; WIEDEMANN *et al.*, 2016). Um die Lokalisation von NimA in *A. fumigatus* genauer zu untersuchen, wurden nachgehend erläuterte Studien durchgeführt.

### 2.1. Untersuchung der Lokalisation eines heterolog in *A. nidulans* exprimierten *A. fumigatus*-NimA-Proteins

Während der Interphase ist ein in dem *A. fumigatus*-Stamm AfS35 exprimiertes NimA-GFP-Fusionsprotein an den Septen einer Hyphe lokalisiert (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte vorerst untersucht werden, ob die Lokalisation des Proteins auch bei heterologer Expression in *A. nidulans* zu dokumentieren ist. Es wurde hierfür ein Konstrukt erstellt, welches die Expression eines NimA-GFP-Fusionsproteins erlaubt. Dieses Konstrukt wurde anschließend in den *A. nidulans* Stamm A26 transformiert. Es zeigte sich, dass das NimA-Protein aus *A. fumigatus* auch bei heterologer Expression in *A. nidulans* an den Septen der Hyphen lokalisiert war (siehe Abbildung 71).



**Abbildung 71: A26 *nimA-gfp***

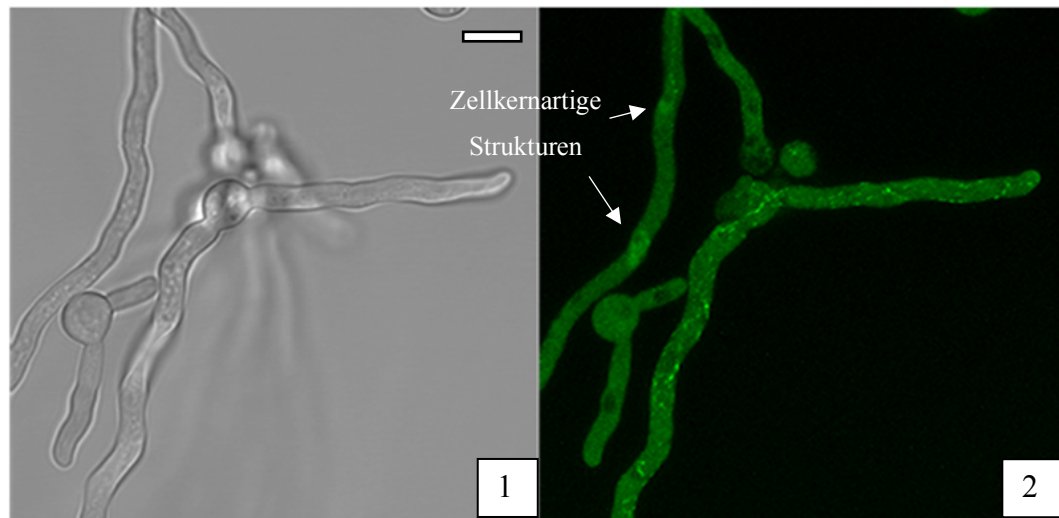
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

- 1: *Bright Field (Single Plane)*
- 2: *Overlay (Single Plane)*
- 3: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Da bereits bekannt war, dass das Fusionsprotein NimA-GFP in AfS35 an den Septen der Hyphen lokalisiert ist und diese Lokalisation nun ebenfalls in A26 beobachtet werden konnte, stellte sich als Nächstes die Frage, welche Lokalisation das Fusionsprotein in einer  $\Delta\rho4$  Mutante aufweisen würde. Der Stamm AfS35  $\Delta\rho4$  bildet aufgrund einer Deletion des *rho4*-Gens nur sehr wenige Septen aus, wodurch NimA nicht an seiner normalen Lokalisation zu finden sein konnte. Um in Erfahrung zu bringen, wo das Protein stattdessen lokalisiert ist, wurde NimA-GFP in AfS35  $\Delta\rho4$  exprimiert und der Stamm AfS35  $\Delta\rho4 + nimA-gfp$  im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es ergaben sich hierbei unterschiedliche Lokalisationen des Fusionsproteins. Einerseits war das Fluoreszenzsignal gleichmäßig in den Hyphen verteilt, mit vereinzelt Arealen stärkeren Signals, die keiner spezifischen Struktur zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 72). Andererseits lag in manchen Hyphen das Fluoreszenzsignal im Bereich runder Strukturen verstärkt vor, bei denen es sich um die Zellkerne handeln konnte (siehe Pfeilmarkierungen in Abbildung 72). In wildtypischen Hyphen verlässt das Protein NimA seine Lokalisation am Septum nur zu Beginn einer Mitose und das auch nur in apikalen Zellkompartimenten, in denen das Hyphenwachstum vorangetrieben wird. Die Mitose wird dabei durch die Anwesenheit von NimA in der Zellkernperipherie eingeleitet (SHEN *et al.*, 2014). In der  $\Delta\rho4$  Mutante beschränkte sich die Fluoreszenzmarkierung der zellkernartigen Strukturen durch das Fusionsprotein NimA-GFP allerdings nicht

auf die apikalen Kompartimente, sondern war in allen Abschnitten einer Hyphe zu beobachten.



**Abbildung 72: AfS35  $\Delta\rho\alpha 4$  + *nimA-gfp***

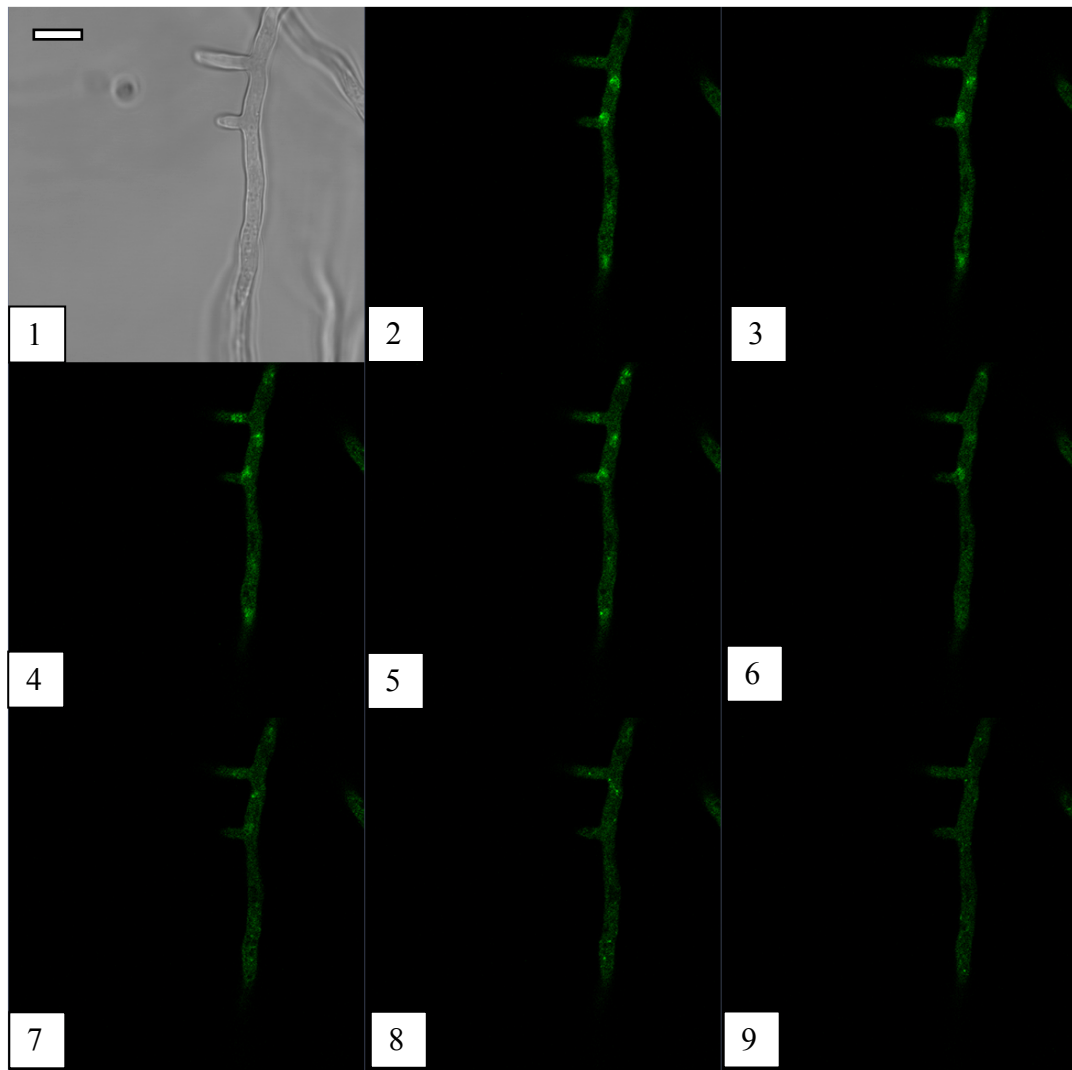
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Die Signalverstärkung im Bereich der Zellkerne war transient. Die Lokalisation von NimA-GFP schien hierbei mit der Mitose in Verbindung zu stehen und löste sich nach kurzer Zeit wieder in einer Verteilung innerhalb des Zytoplasmas auf (siehe Abbildung 73).



**Abbildung 73: Afs35  $\Delta\rho\sigma 4$  + *nimA-gfp***

Aufnahmen in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop, alle 30 s

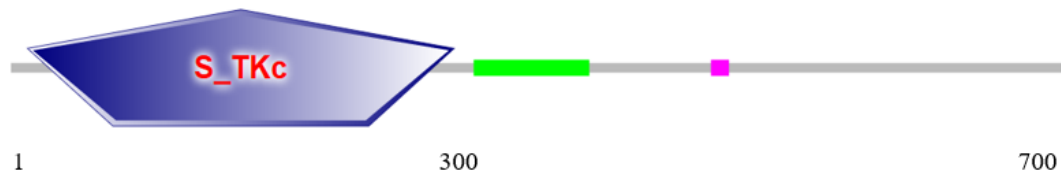
Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2-9: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

## 2.2. Untersuchung der Lokalisation verkürzter NimA-Teilproteine in *A. fumigatus*

Die zuvor geschilderten Studien wurden mit unverkürzten NimA-Fusionsproteinen durchgeführt. Es sollte nun in einem nächsten Schritt untersucht werden, welcher Abschnitt des *nimA*-Gens die Information für die Lokalisation des Proteins am Septum enthielt. Hierfür wurden diverse Konstrukte erstellt, die unterschiedliche Bereiche von *nimA* als Teilproteine in Fusion mit GFP in Afs35 exprimierten. Abbildung 74 beinhaltet eine schematische Darstellung von NimA mit Kennzeichnung der im Folgenden näher untersuchten Domänen des Proteins.



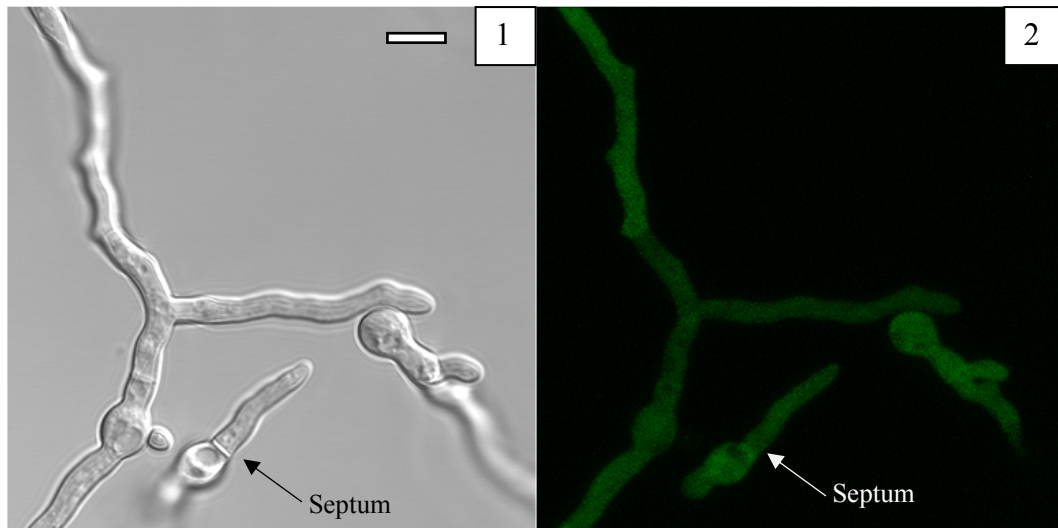
**Abbildung 74: Das Protein NimA aus *A. fumigatus* (NimA<sub>1-700</sub>)**

S\_TKc: katalytische Tyrosin-Kinase-Domäne

grün: *coiled coil region*

pink: *low complexity region*

Das zuerst untersuchte Fusionsprotein stellte NimA<sub>1-301</sub>-GFP dar, welches die Kinase-Domäne (NimA<sub>11-295</sub>) des Proteins beinhaltete. Der Stamm AfS35 *nimA*<sub>1-301</sub>-*gfp* zeigte bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Zytoplasmafluoreszenz ohne eine Fluoreszenzmarkierung der Septen (siehe Abbildung 75).



**Abbildung 75: AfS35 *nimA*<sub>1-301</sub>-*gfp***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

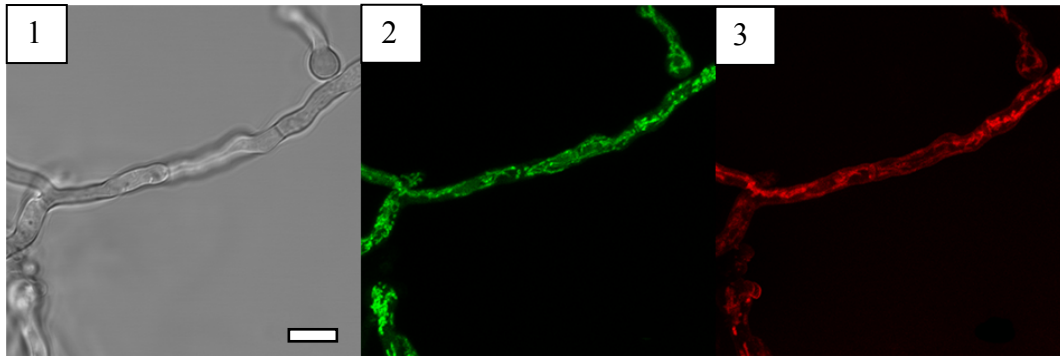
1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Die Information zur Lokalisation des Fusionsproteins am Septum war offenbar in den Aminosäuren NimA<sub>1-301</sub> nicht vorhanden. Deshalb wurde als Nächstes die andere Hälfte des Proteins (NimA<sub>296-700</sub>) als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Der Abschnitt NimA<sub>296-700</sub> entsprach der *coiled coil*-Domäne des Proteins (NimA<sub>296-378</sub>) sowie dem C-Terminus. Der Stamm AfS35 *nimA*<sub>296-700</sub>-*gfp* wies bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine ungewöhnliche, filamentöse Fluoreszenzmarkierung auf, die einem für Mitochondrien zu



erwartendem Muster entsprach. Nach einer Behandlung der Hyphen mit dem die Mitochondrien anfärbenden Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Deep Red FM (angewendet in einer Endkonzentration von 100 nM) wurde der Stamm erneut fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins NimA<sub>296-700</sub>-GFP entsprach hierbei stets dem Fluoreszenzsignal der Mito Tracker-Färbung (siehe Abbildung 76). Die Lokalisation des Fusionsproteins NimA<sub>296-700</sub>-GFP konnte dadurch eindeutig den Mitochondrien zugeordnet werden.



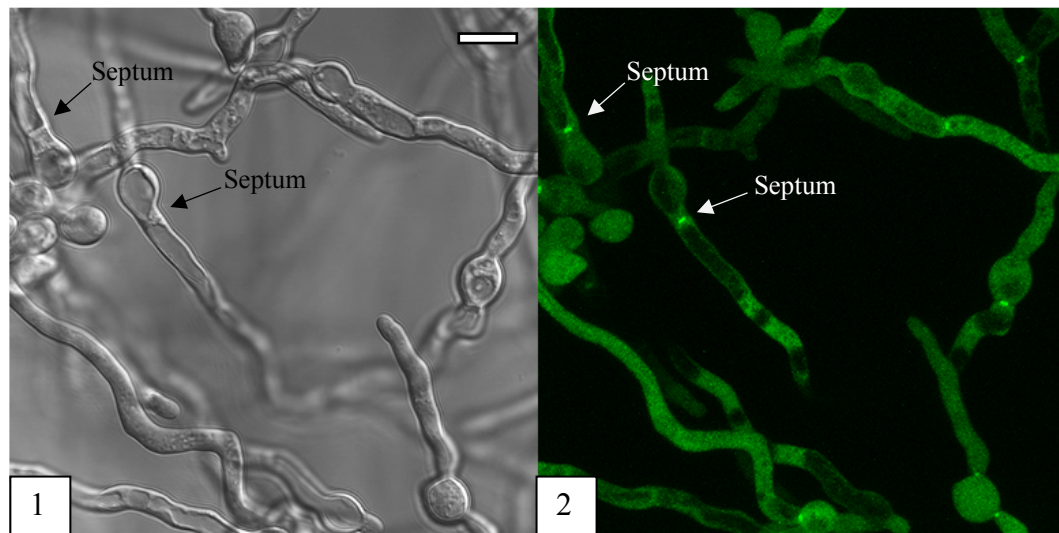
**Abbildung 76: AfS35 *nimA*<sub>296-700</sub>-gfp**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

- 1: *Bright Field (Single Plane)*
- 2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*
- 3: *Mito Tracker-Färbung (Maximum Intensity Projection)*

Aufgrund der unerwarteten Lokalisation von NimA<sub>296-700</sub>-GFP an den Mitochondrien wurde dieser Teil des NimA-Proteins eingehender untersucht. Eine naheliegende Herangehensweise hierfür stellte die weitere Verkürzung des Teilproteins NimA<sub>296-700</sub> dar. Es folgte daher die Herstellung eines Konstruktes, welches ein NimA<sub>379-700</sub>-GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Der Stamm AfS35 *nimA*<sub>379-700</sub>-gfp wies ein verstärktes Fluoreszenzsignal an den Septen sowie eine körnige, zytoplasmatische Fluoreszenz auf (siehe Abbildung 77).



**Abbildung 77: AfS35 *nimA*<sub>379-700</sub>-gfp**

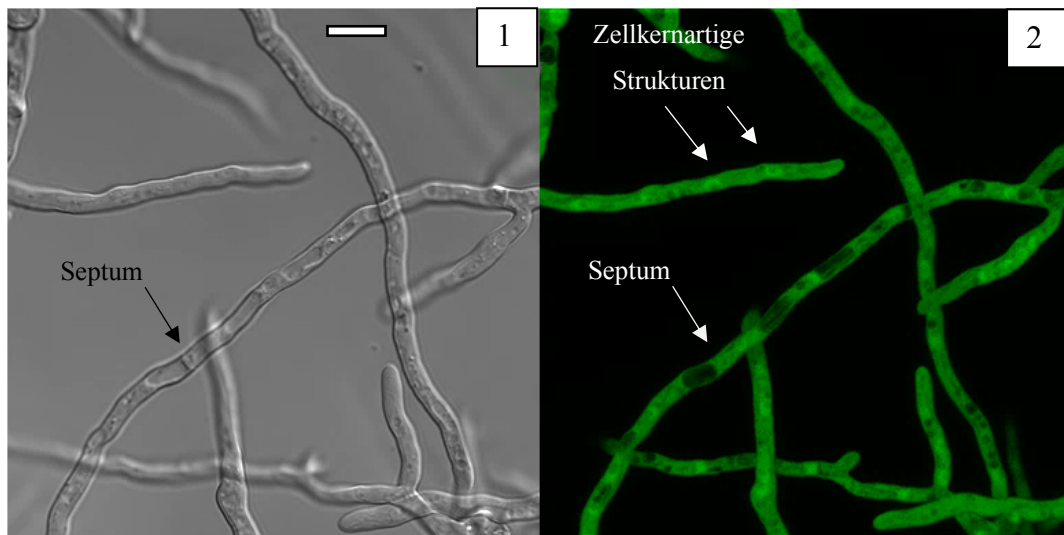
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Der C-Terminus von NimA schien also zumindest teilweise an der Lokalisation des Proteins an den Septen einer Hyphe beteiligt zu sein. Die mitochondriale Lokalisation war bei diesem Teilprotein nicht mehr zu beobachten. Die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus den Aminosäuren NimA<sub>292-378</sub>, der *coiled coil*-Domäne des NimA-Proteins, und GFP in AfS35 führte ebenso wenig zu einer Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien. Das Fusionsprotein NimA<sub>292-378</sub>-GFP war auch nicht an den Septen lokalisiert, sondern wies eine zytoplasmatische Lokalisation auf. Teilweise war zudem eine schwache Fluoreszenzmarkierung an zellkernartigen Strukturen darstellbar (siehe Abbildung 78).



**Abbildung 78: AfS35 *gfp-nimA*<sub>292-378</sub>**

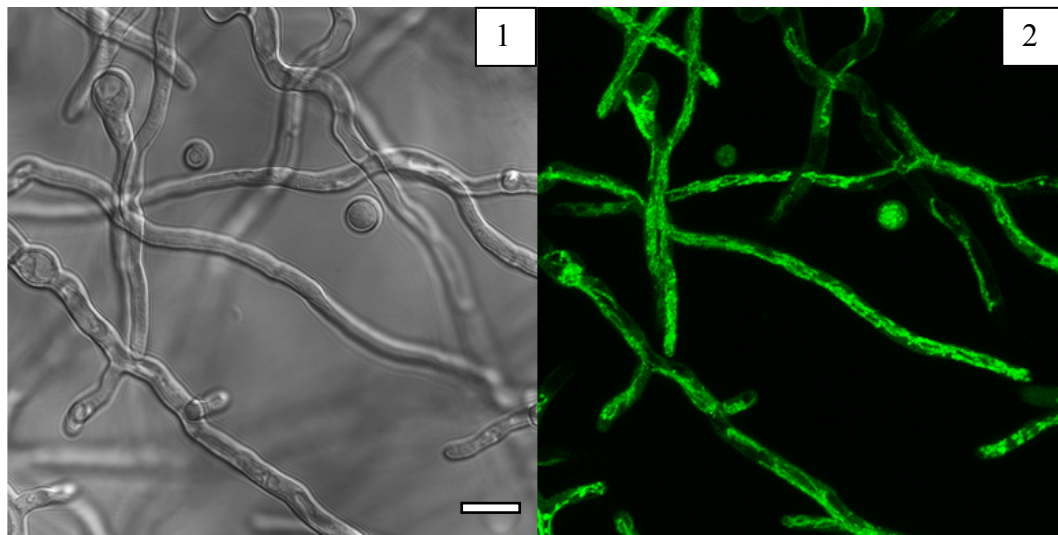
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Weder bei AfS35 *nimA*<sub>379-700</sub>-*gfp* noch bei AfS35 *nimA*<sub>292-378</sub>-*gfp* konnte eine mitochondriale Lokalisation des Fusionsproteins festgestellt werden. Die Halbierung des Bereiches von NimA<sub>296-700</sub> führte demnach zum Verlust der spezifischen Lokalisation an den Mitochondrien. Eine mögliche Schlussfolgerung war, dass die genetische Information hierfür mittig in der Sequenz von *nimA*<sub>296-700</sub> vorliegt. Somit konnte sie durch die Halbierung des Bereiches verloren gehen. Um dies zu klären, wurde im Anschluss eine weniger stark verkürzte Sequenz des C-terminalen Abschnittes von NimA als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch auf seine Lokalisation hin getestet. Es wurde ein Konstrukt erstellt, in welchem das Teilprotein NimA<sub>296-700</sub> C-terminal um 100 Aminosäuren verkürzt wurde. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Stammes AfS35 *nimA*<sub>296-601</sub>-*gfp* wies das Fusionsprotein, genau wie NimA<sub>296-700</sub>-GFP, eine Lokalisation an den Mitochondrien der Hyphen auf (siehe Abbildung 79).



**Abbildung 79: AfS35 *nimA*<sub>296-601</sub>-gfp**

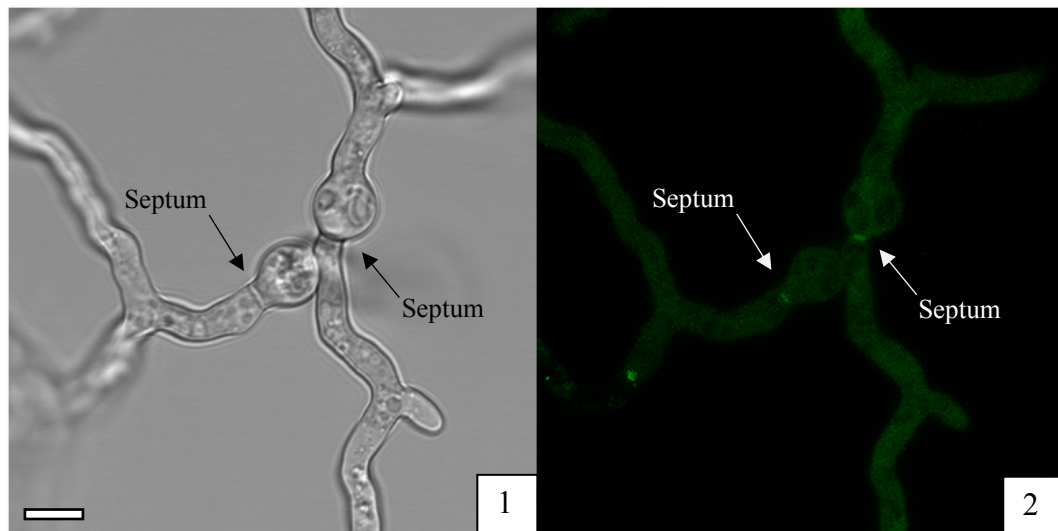
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Die Aminosäuresequenz, die eine Lokalisation an den Mitochondrien hervorrief, konnte damit auf NimA<sub>296-601</sub> eingegrenzt werden. Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten allerdings nur aufgrund der zufällig entdeckten distinkten Lokalisation dieses Teilproteins. Die ursprünglich ausschlaggebende Identifizierung der für die Septumlokalisation von NimA verantwortlichen Sequenz wurde parallel weitergeführt. Es sollte das für die Lokalisation am Septum nötige Motiv möglichst exakt eingegrenzt werden. Im Hinblick darauf, dass NimA<sub>1-301</sub>-GFP nicht am Septum lokalisiert war, wurde im Anschluss ein Konstrukt erstellt, welches das NimA-Protein C-terminal um lediglich 100 Aminosäuren verkürzte. Das Fusionsprotein NimA<sub>1-601</sub>-GFP wurde in AfS35 exprimiert und wies bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Lokalisation am Septum auf (siehe Abbildung 80).



**Abbildung 80: AfS35 *nimA*<sub>1-601</sub>-gfp**

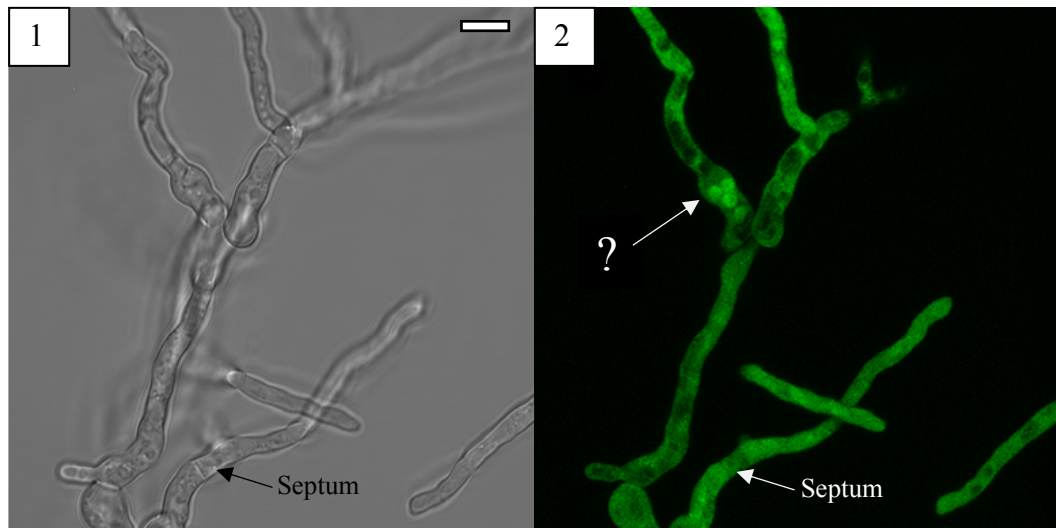
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Die Deletion von 100 C-terminalen Aminosäuren führte demnach nicht zu einem Verlust der Septumlokalisation des Fusionsproteins. Ein anderes Ergebnis lieferte eine Verkürzung um 200 Aminosäuren. Im Stamm AfS35 *nimA*<sub>1-500</sub>-gfp wurde das Fusionsprotein NimA<sub>1-500</sub>-GFP bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung im Zytoplasma nachgewiesen. Der Verlust der Aminosäuren NimA<sub>501-600</sub> führte dazu, dass das Fusionsprotein in AfS35 nicht mehr am Septum lokalisiert war. Interessant war an diesem Stamm zudem, dass sich das Fluoreszenzsignal vereinzelt zu rundlichen Strukturen verstärkte, wobei nicht ersichtlich war, ob diese Strukturen Vakuolen oder Zellkerne darstellten (siehe Abbildung 81).



**Abbildung 81: AfS35 *nimA*<sub>1-500</sub>-gfp**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

- 1: *Bright Field (Single Plane)*
- 2: *GFP (Single Plane)*
- 3: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

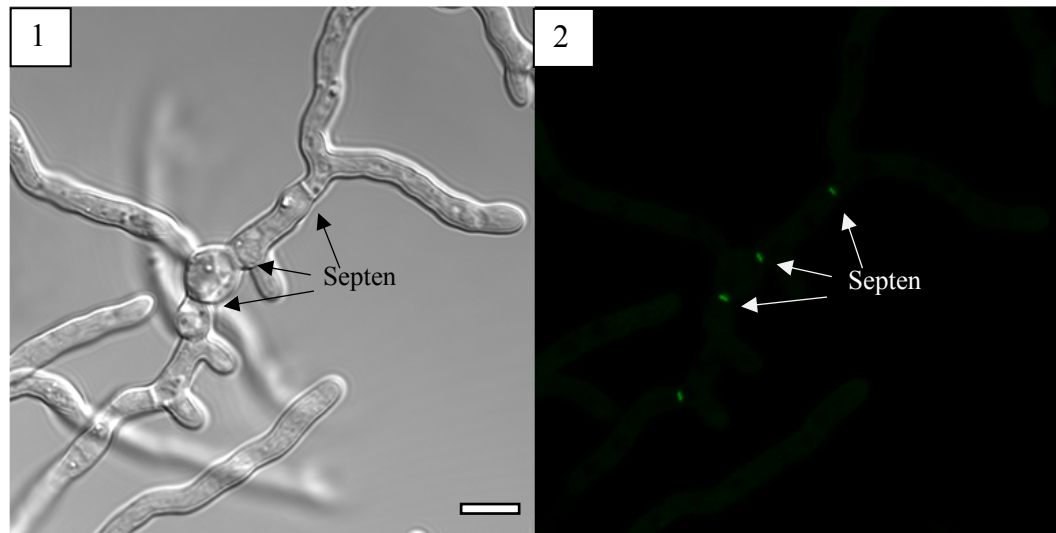
### 2.3. Manipulationen der Aminosäuresequenz von NimA

Die Proteinkinase NimA wurde im Zuge der zuvor geschilderten Untersuchungen näher auf ihre Lokalisation an den Septen einer Hyphe hin charakterisiert. NimA verlässt seine Lokalisation am Septum zu Beginn einer Mitose und transloziert in die Zellkernperipherie apikaler Zellkompartimente. Die Mitose wird durch die Anwesenheit von NimA in der Zellkernperipherie eingeleitet (SHEN *et al.*, 2014). Die Translokation von NimA in die Peripherie der Zellkerne konnte im Zuge dieser Arbeit unter anderem bei dem Stamm AfS35 *Δrho4* + *nimA-gfp* beobachtet werden (siehe Abschnitt 2.1.). Das Fusionsprotein NimA-GFP befand sich dort aufgrund der verminderten Septenbildung des Stammes während der Interphase im Zytoplasma. Es konnte zudem bereits festgestellt werden, dass die Kinase-Domäne am N-terminalen Ende des Proteins nicht essentiell für die distinkte Lokalisation am Septum ist. Was bislang jedoch noch nicht untersucht wurde, war, welcher Abschnitt des Proteins für dessen Translokation vom Septum in Richtung Zellkernperipherie zu Beginn einer Mitose verantwortlich ist. Eine naheliegende Option stellt dabei die Kinase-Domäne des Proteins dar. Um in Erfahrung zu bringen, ob die Aktivität der Kinase-Domäne für die Lokalisation und Translokation des Proteins wichtig ist, sollte die Kinase-Domäne durch Mutationen inaktiviert werden. Hierfür wurde vorerst in der Literatur nach Hinweisen auf

potentielle Zielstrukturen für eine Beeinflussung der Kinase-Aktivität von NimA gesucht. Es sind für *A. nidulans* mehrere unterschiedliche Ansätze beschrieben, die im Zuge der vorliegenden Arbeit auf NimA aus *A. fumigatus* übertragen und getestet wurden. Dafür wurden vorerst die Aminosäuresequenzen der homologen NimA-Proteine aus *A. nidulans* und *A. fumigatus* miteinander verglichen, um sicher zu stellen, dass die in der Literatur beschriebenen Mutationen auch auf NimA aus *A. fumigatus* anwendbar waren. Ein Aminosäuresequenz-Alignment zeigte, dass die beiden Proteine eine zu 100 % identische Sequenz aufweisen (siehe Anhang Abbildung A 17). Nach dieser Erkenntnis erfolgten unterschiedliche Mutation in der Kinase-Domäne von NimA aus *A. fumigatus*, die nun näher beschrieben werden sollen.

Eine von Knighton *et al.* (1991) durchgeführte Strukturanalyse des Proteins ergab, dass NimA ein aktives Zentrum, einen sogenannten *catalytic loop*, im Bereich der Aminosäuren NimA<sub>165-171</sub> aufweist. Die beteiligten Aminosäuren liegen in der Gruppe der Proteinkinasen gut konserviert vor. Speziell der Asparaginsäure (D) an Position NimA<sub>166</sub> wurde innerhalb dieses katalytischen Zentrums eine wichtige Rolle bei der Katalysereaktion zugeschrieben (KNIGHTON *et al.*, 1991). In einer späteren Studie konnte erneut die Aminosäure NimA<sub>166</sub> als essentiell für die Kinaseaktivität identifiziert werden (VALIEV *et al.*, 2003), so dass diese Position in der Kinase-Domäne von NimA als erster Angriffspunkt für eine Beeinflussung der Kinaseaktivität des Proteins ausgewählt wurde. Es wurde ein Konstrukt erstellt, bei dem an NimA<sub>166</sub> das für Asparaginsäure (D) codierende Basentriplett GAC in das für die Aminosäure Alanin (A) codierende Basentriplett GCC umgewandelt wurde. Alanin wurde dabei mit Bedacht gewählt, da die Mutation D166A neben dem Austausch der Aminosäuren zudem eine Ladungsverschiebung (sauer geladene Asparaginsäure zu ungeladenem Alanin) innerhalb des katalytischen Zentrums hervorruft. Durch diesen Eingriff in die Aminosäuresequenz konnte erwartet werden, dass die Kinase-Funktion von NimA beeinträchtigt wird. Als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert wies NimA<sup>(D166A)</sup> eine Lokalisation am Septum auf (siehe Abbildung 82).





**Abbildung 82: AfS35 *nimA*<sup>(D166A)</sup>-gfp**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

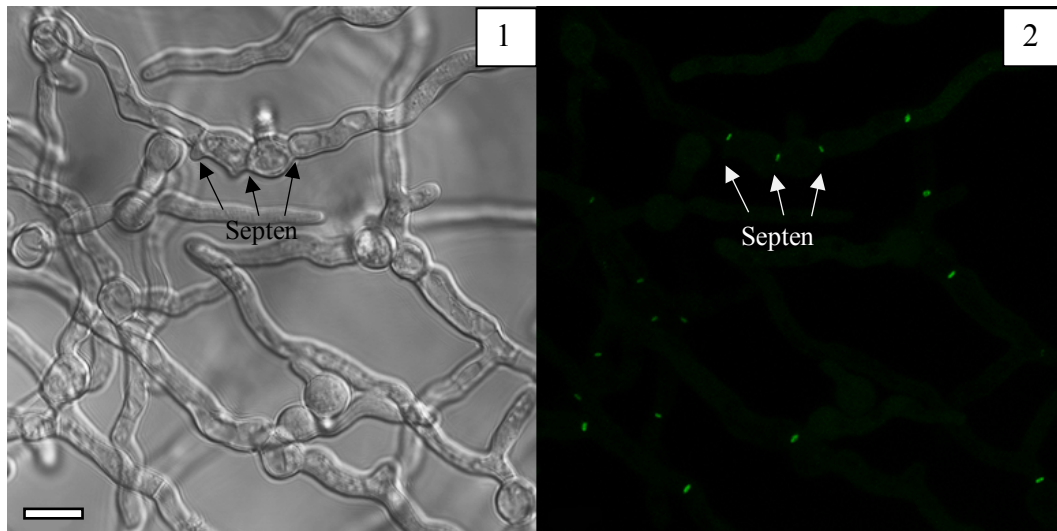
Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Eine ebenfalls in der Literatur beschriebene Aminosäuresubstitution stellt die Mutation K40M der Aminosäure NimA<sub>40</sub> dar. Die Mutation, bei der Lysin (K) an Position NimA<sub>40</sub> durch ein Methionin (M) ersetzt wird, führt in *A. nidulans* zu einer Inaktivierung der Kinase-Domäne (LU & MEANS, 1994). Diese Mutation wurde nun für NimA aus *A. fumigatus* durchgeführt. Das Basentriplett AAA von NimA<sub>40</sub>, codierend für die Aminosäure Lysin (K), wurde durch das für die Aminosäure Methionin (M) codierende Basentriplett ATG ersetzt. NimA<sup>(K40M)</sup> wurde als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert und der entstandene Stamm fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das in seiner Kinase-Domäne mutierte NimA<sup>(K40M)</sup>-Molekül war nach wie vor an den Septen der Hyphen lokalisiert (siehe Abbildung 83).





**Abbildung 83: AfS35 *nimA*<sup>(K40M)</sup>-gfp**

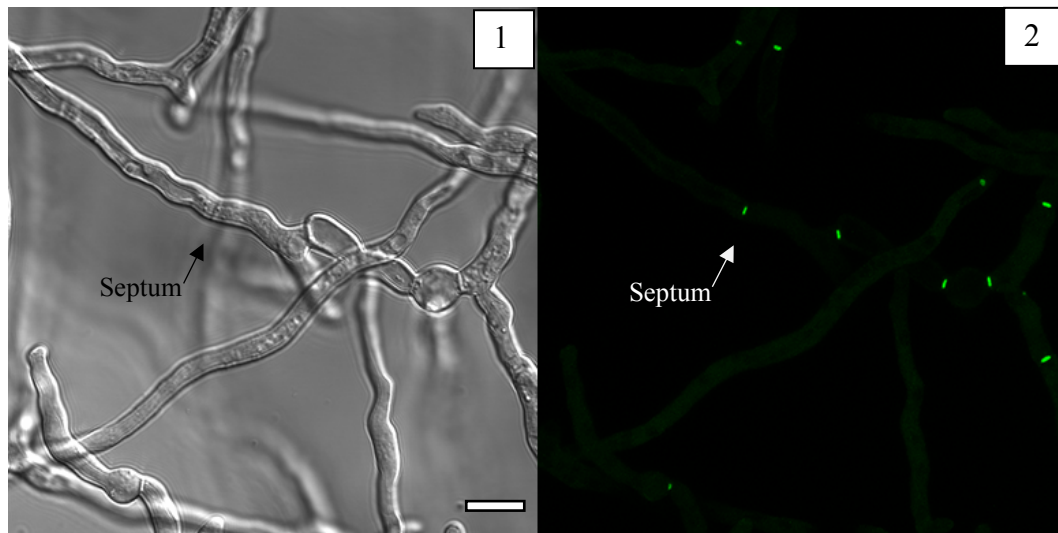
Aufnahme in Life Cell Imaging-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Eine weitere durchgeführte Beeinflussung der Kinase-Domäne von NimA stellte die sogenannte *nimA5* Mutation dar. Diese in der Literatur beschriebene Mutation betrifft die Aminosäure NimA<sub>91</sub> und resultiert in *A. nidulans* in einem Temperatursensitiven NimA-Molekül. Bei dem Überschreiten einer kritischen Temperatur (37 °C) führt *nimA5* zu einer Umfaltung des NimA-Proteins und damit zu einem Arrest der Zellen im Stadium G2 des Zellzyklus (LU & MEANS, 1994; GOVINDARAGHAVAN *et al.*, 2014). Die Mutation von NimA<sub>91</sub> wurde im Zuge der Untersuchungen durch die Substitution des nativen Basentriplett TAC in AAC durchgeführt, wobei die ursprüngliche Codierung der Aminosäure Tyrosin (Y) in die Aminosäure Asparagin (N) umgewandelt wurde. Das *nimA5* mutierte NimA<sup>(Y91N)</sup>-Protein wurde als Fusionsprotein mit GFP in AfS35 exprimiert. Der entstandene Stamm AfS35 *nimA*<sup>(Y91N)</sup>-gfp wurde im Anschluss bei 30 °C über Nacht angezogen und am nächsten Tag bei Raumtemperatur fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Fusionsprotein NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP war an den Septen lokalisiert (siehe Abbildung 84).



**Abbildung 84: AfS35 *nimA*<sup>(Y91N)</sup>-gfp**

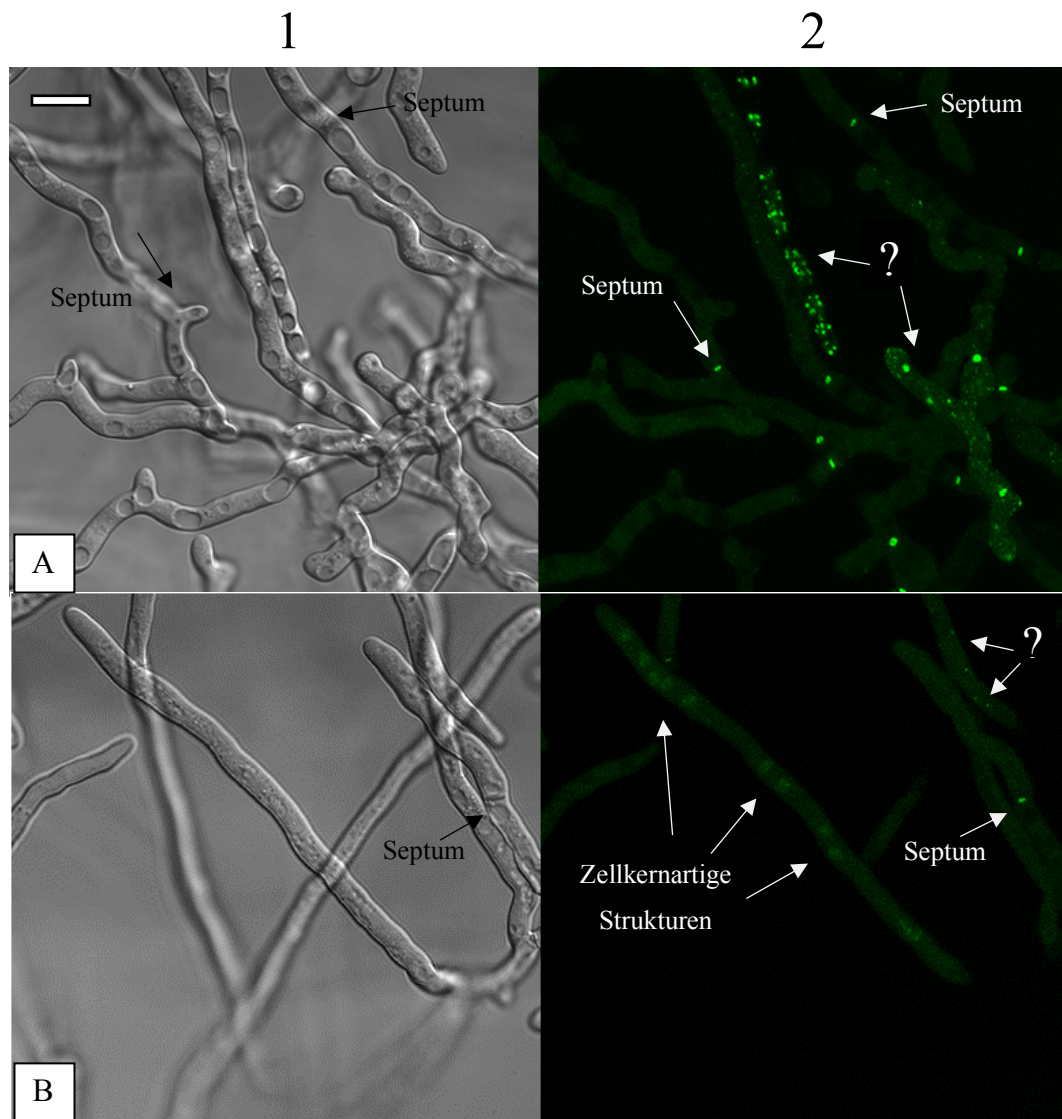
Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, wodurch der Theorie zufolge eine Umfaltung des Proteins im Bereich der *nimA5* Mutation erfolgte, die eine Inaktivierung der Kinase-Domäne nach sich zog. Nach einer dreistündigen Inkubation wurde der Stamm erneut fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Fusionsprotein befand sich zum Teil nach wie vor an den Septen der Hyphen, es konnten jedoch zudem in einigen Hyphen distinkte, punktförmige Fluoreszenzmarkierungen beobachtet werden, die ungleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorlagen (siehe Abbildung 85, A). Außerdem konnten in einer Hyphe Fluoreszenzsignale an rundlichen, zentral in der Hyphe gelegenen, zum Teil paarweise angeordneten Strukturen dokumentiert werden. Aufgrund der Lage und Form der Fluoreszenzmarkierungen könnte es sich dabei um eine Lokalisation des NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP-Fusionsproteins in der Peripherie der Zellkerne handeln (siehe Abbildung 85, B).



**Abbildung 85: AfS35 *nimA*<sup>(Y91N)</sup>-gfp**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop, Anzucht bei 30 °C mit darauffolgender Inkubation bei 37 °C für 3 h

Maßstab: 5 µm

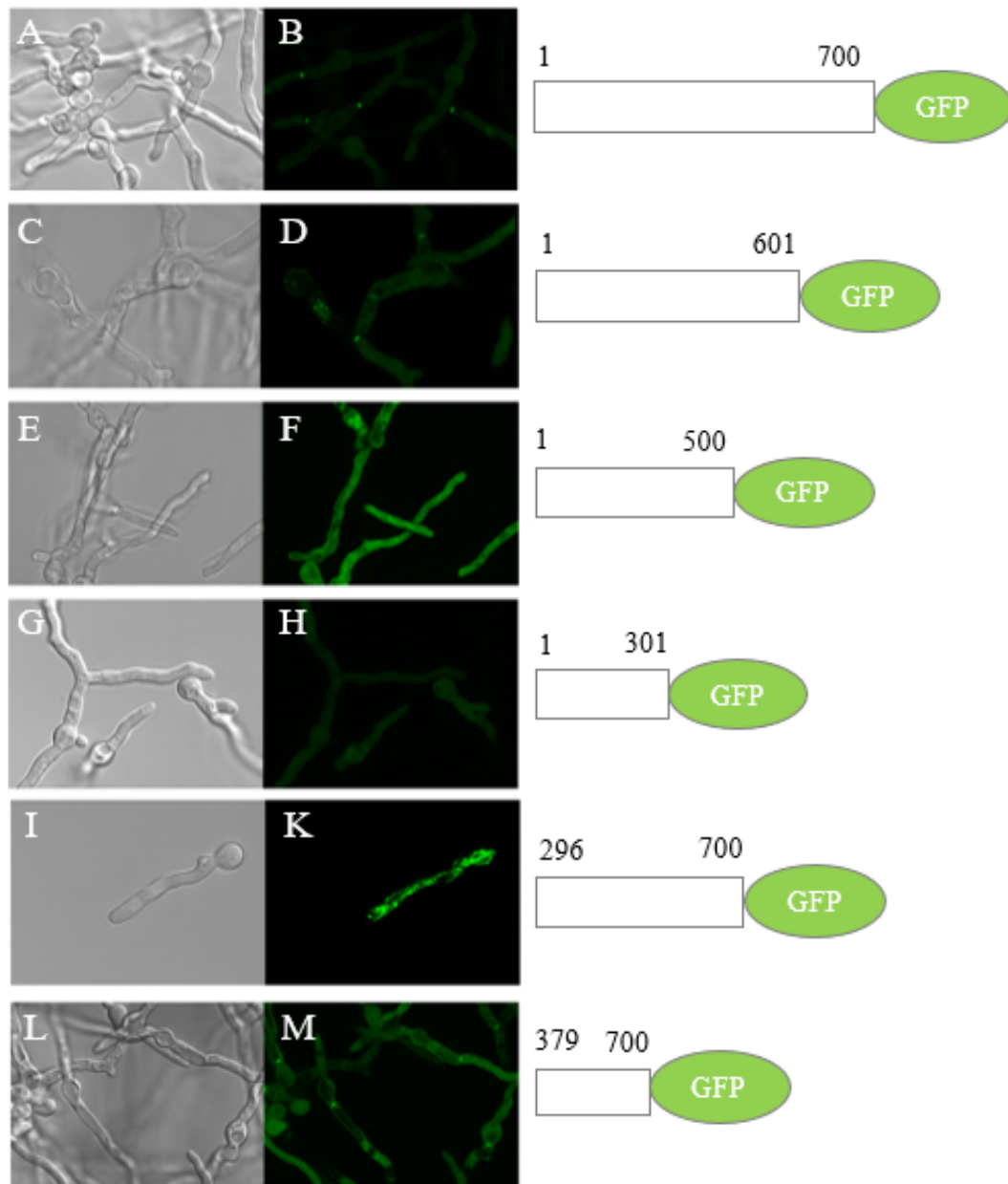
A: Hyphen mit Fluoreszenzmarkierungen an Septen und punktförmigen Strukturen

B: Hyphe mit Fluoreszenzmarkierung an zellkernartigen Strukturen

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

Abbildungen 86 und 87 bieten eine Übersicht über alle im Zuge dieser Arbeit erstellten NimA-Konstrukte.



**Abbildung 86: Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisation von NimA in AfS35 (1)**

Aufnahmen in *Life Cell Imaging*-Kammern an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

A, C, D, E, G, I, L: *Bright Field (Single Plane)*

B, D, F, H, K, M: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

A, B: *AfS35 nimA-gfp*

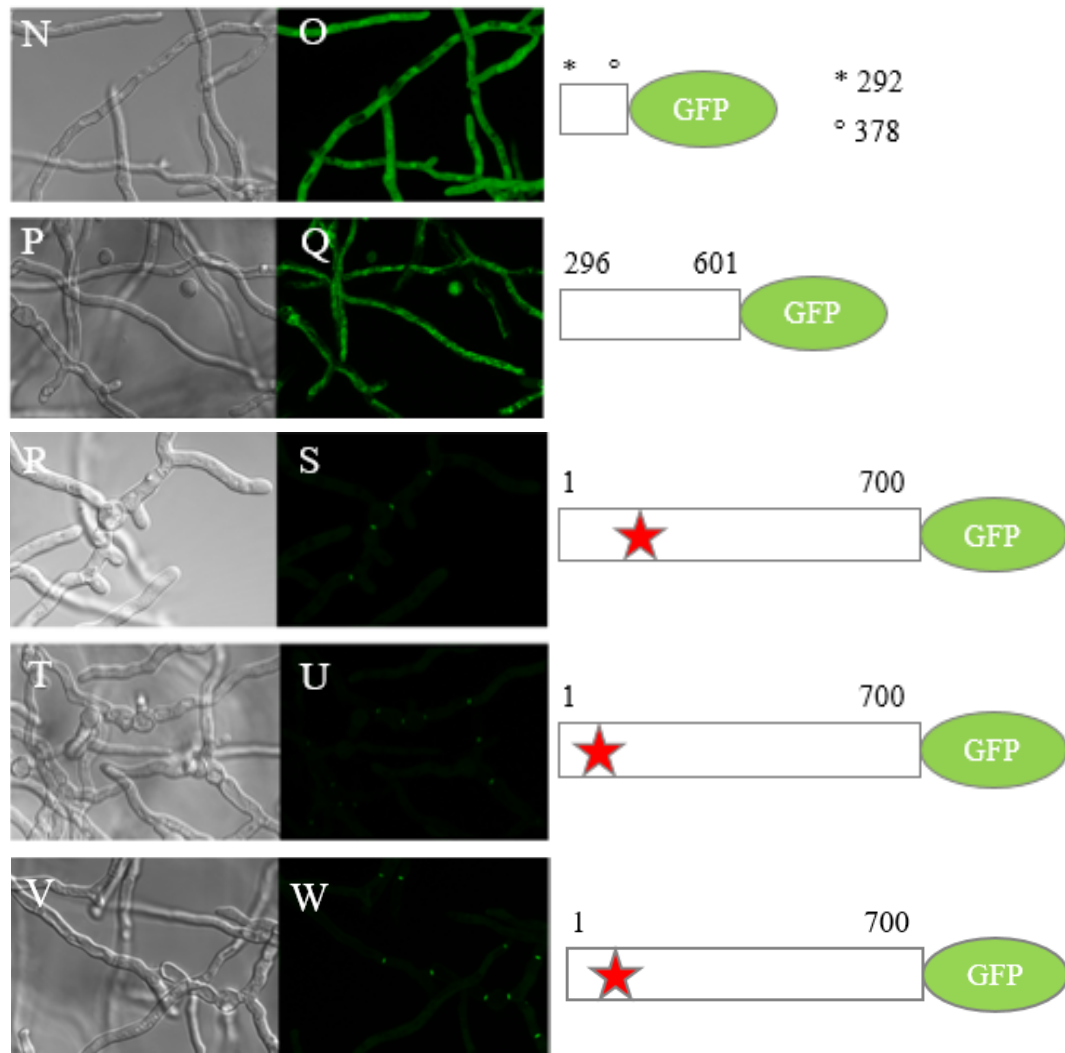
C, D: *AfS35 nimA<sub>1-601</sub>-gfp*

E, F: *AfS35 nimA<sub>1-500</sub>-gfp*

G, H: *AfS35 nimA<sub>1-301</sub>-gfp* (Kinase-Domäne)

I, K: *AfS35 nimA<sub>296-700</sub>-gfp*

L, M: *AfS35 nimA<sub>379-700</sub>-gfp* (C-Terminus)



**Abbildung 87: Übersicht der Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisation von NimA in AfS35 (2)**

Aufnahmen in *Life Cell Imaging*-Kammern an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5 µm

N, P, R, T, V: *Bright Field (Single Plane)*

O, Q, S, U, W: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

N, O: *AfS35 nimA<sub>292-378</sub>-gfp (coiled coil-Domäne)*

P, Q: *AfS35 nimA<sub>296-601</sub>-gfp*

R, S: *AfS35 nimA<sup>(D166A)</sup>-gfp*

T, U: *AfS35 nimA<sup>(K40M)</sup>-gfp*

V, W: *AfS35 nimA<sup>(Y91N)</sup>-gfp*

#### Schematische Darstellung der Fusionsproteine



: Substitution einer Aminosäure

## V. DISKUSSION

### 1. TcsC-/NikA-Studie

#### 1.1. TcsC und NikA sind im Zellkern lokalisierte Proteine

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien dienten der näheren Charakterisierung der Gruppe III-HHK TcsC der pathogenen Schimmelpilz-Spezies *Aspergillus fumigatus*. Aufgrund der Tatsache, dass *Aspergillus* spp. sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als Pathogene zu teils schweren Erkrankungen mit hohen Mortalitätsraten führen können, jedoch derzeit nur eine begrenzte Anzahl an Therapieoptionen für Aspergillosen existiert, beschäftigen sich viele wissenschaftliche Arbeiten mit der Suche nach neuartigen antimykotischen Wirkstoffen (PERFECT, 2017). Eine mögliche Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antimykotika stellt dabei der osmosensitive *High Osmolarity Glycerol* (HOG)-Signalweg dar, eine Enzymkaskade, die maßgeblich an der Regulation des zellulären Flüssigkeitshaushaltes unter hyper- und hypoosmotischen Bedingungen beteiligt ist (HOHMANN, 2002; CATLETT *et al.*, 2003; BAHN, 2008; DEFOSSE *et al.*, 2015; SHOR & CHAUHAN, 2015). Aufgrund der Funktion von TcsC als Sensorprotein und Regulativ des HOG-Signalwegs lag der Fokus der vorliegenden Arbeit darin, dieses Protein hinsichtlich seiner Aktivität zu untersuchen und charakterisieren. Es wurde allerdings neben TcsC auch vergleichend mit dem zu TcsC homologen Protein NikA in *A. nidulans* gearbeitet. Als gering pathogene *Aspergillus*-Spezies stellt *A. nidulans* einen Modellorganismus dar, der in vielen wissenschaftlichen Studien Verwendung findet. Aus diesem Grund wurde NikA als ein Bestandteil der Studien in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Bei *A. nidulans* stellte sich im Zuge der Untersuchungen bald heraus, dass diese Spezies eine natürliche Resistenz gegenüber dem Fungizid Pyrithiamin aufweist. Bei Arbeiten mit *A. fumigatus* wurde Pyrithiamin im Zuge gentechnischer Manipulationen routinemäßig als Selektionsmarker eingesetzt, bei *A. nidulans* war dies jedoch aufgrund dessen natürlicher Resistenz nicht möglich. Nachdem diese Resistenz erkannt wurde, wurde *A. nidulans* vorerst auf seine Sensibilität anderen Fungiziden gegenüber getestet. Hierbei bewährte sich der Selektionsmarker Hygromycin. Es mussten nun alternative Herangehensweisen für die Arbeiten mit *A. nidulans* entwickelt werden, da die für Studien mit *A. fumigatus* hergestellten Plasmide keine Hygromycin-

sondern Pyrithiamin-Resistenzkassetten beinhalteten und somit bei dem Einsatz der Plasmide bei *A. nidulans* keine Selektion von Transformationsklonen erfolgen konnte. Ein alternatives Verfahren stellte die sogenannte Ko-Transformation zweier Plasmide dar. Dabei wurde zum einen der Vektor pSK379 transformiert, der die gewünschte genetische Information lieferte, jedoch eine Pyrithiamin-Resistenzkassette beinhaltet (siehe Anhang Abbildung A 2). Als zweiter Vektor wurde das Plasmid pSilent eingesetzt, welches eine Hygromycin-Resistenzkassette beinhaltet und bei den entstehenden Ko-Transformationsklonen eine Resistenz gegenüber Hygromycin hervorrief. Diese Ko-Transformationen fanden bei *A. nidulans* über einen längeren Zeitraum erfolgreich Anwendung. Da jedoch bei den Ko-Transformationsstämmen kein Selektionsdruck auf den Vektor pSK379 ausgeübt werden konnte, bestand die Gefahr, dass die über pSK379 vermittelte genetische Information im Laufe der Zeit wieder verloren ging. Um diese Instabilität zu umgehen, wurde deshalb der Vektor pSK379 per Mutations-PCR umgebaut, wobei die Pyrithiamin- durch die Hygromycin-Resistenzkassette aus pSilent ersetzt wurde. Das neu erstellte Plasmid wurde als pSK379-*hygromycin* (siehe Anhang Abbildung A 5) bezeichnet und konnte wie pSK379 mit den gewünschten Gensequenzen ausgestattet werden. Die bei der Transformation des Plasmids entstehenden Stämme konnten nun über ihre Hygromycin-Resistenz selektiert werden.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Lokalisation und Funktion der Gruppe III-HHK TcsC. Vorergebnisse von Dr. Anja Spadinger erbrachten Hinweise darauf, dass es sich bei TcsC wider Erwarten nicht um ein im Zytoplasma einer Hyphe befindliches Protein handelt. Es war stattdessen in organellartigen Strukturen lokalisiert, bei denen es sich mutmaßlich um die Zellkerne handelte. Fluoreszenzmikroskopische Studien des Stammes AfS35 *gfp-tcsC*, der ein Fusionsproteins bestehend aus TcsC sowie dem grün autofluoreszierenden Protein GFP exprimiert, zeigten Fluoreszenzmarkierungen in Hyphen, die den Zellkernen ähnelten. Diese distinkte Lokalisation von GFP-TcsC konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Bevor die Lokalisation durch fortführende Maßnahmen weiter studiert wurde, sollte vorerst untersucht werden, ob die Lage von GFP im Fusionsprotein möglicherweise Auswirkungen auf die Lokalisation des Fusionsproteins in der Hyphe hat. Im Fusionsprotein GFP-TcsC befindet sich GFP am N-terminalen Ende von TcsC. Es



wurde deshalb zusätzlich das Fusionsprotein TcsC-GFP konstruiert, in dem sich GFP am C-terminalen Ende von TcsC befindet. Eine Expression von TcsC-GFP in AfS35 führte ebenfalls zu der bei GFP-TcsC beobachteten distinkten Lokalisation. Das heißt, dass die Lage von GFP innerhalb des Fusionsproteins keine Auswirkungen auf die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb einer Hyphe hat. Um nun nachweisen zu können, dass die fluoreszenzmarkierten Strukturen tatsächlich die Zellkerne darstellten, musste zusätzlich eine von TcsC unabhängige Zellkernmarkierung in den Hyphen erfolgen. Als für diese Funktion geeignet erwies sich das sowohl in *A. fumigatus* als auch *A. nidulans* vorkommende Protein StuA. Studien an *A. nidulans* konnten zeigen, dass die 156 C-terminalen Aminosäuren von StuA eine putative Zellkernlokalisationsdomäne ergeben (SUELMANN *et al.*, 1997). Das verkürzte Teilprotein StuA<sub>C-Terminus</sub> wurde deshalb mit dem rot autofluoreszierenden Protein RFP fusioniert und als Zellkernmarker eingesetzt. RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> wurde in dem bereits mit dem Fusionsprotein GFP-TcsC ausgestatteten Stamm AfS35 *gfp-tcsC* exprimiert und der neu konstruierte Stamm AfS35 *gfp-tcsC + rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub>* fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Untersuchung ergab, dass die Lokalisation des grün fluoreszenzmarkierten TcsC-Moleküls stets der über das Fusionsprotein RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> vermittelten roten Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne entsprach. Ein Unterschied der beiden Proteine liegt allerdings darin, dass bei dem grünen Fluoreszenzsignal von GFP-TcsC im Zellkern der kleine Bereich des Nucleolus ausgespart blieb. Das von RFP-StuA<sub>C-Terminus</sub> vermittelte rote Fluoreszenzsignal dagegen färbte den gesamten Zellkern. Dies bedeutet, dass TcsC im Zellkern, jedoch nicht im Nucleolus lokalisiert ist.

Wie zu Beginn erläutert, wurden viele Studien vergleichend an den verwandten Spezies *A. fumigatus* und *A. nidulans* durchgeführt. Aufgrunddessen erfolgte nach Verifizierung der Zellkernlokalisation von TcsC eine vergleichende Untersuchung des homologen Proteins NikA. Es wurde ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und NikA konstruiert und im *A. nidulans*-Stamm A26 exprimiert. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des entstandenen Stammes A26 *gfp-nikA* zeigte, dass GFP-NikA genau wie GFP-TcsC im Zellkern lokalisiert ist. Es konnte zudem genau wie bei TcsC beobachtet werden, dass die C- oder N-terminale Lage von GFP im NikA-Fusionsprotein keine Auswirkungen auf dessen Lokalisation hatte. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass TcsC auch in heterologer



Expression in A26 die Fähigkeit, in den Zellkern einzuwandern, beibehält.

Es war nun gezeigt worden, dass die Fusionsproteine GFP-TcsC und GFP-NikA in *A. fumigatus* (Stamm AfS35) bzw. *A. nidulans* (Stamm A26) im Zellkern lokalisiert sind. Es bestand dabei die Möglichkeit, dass die Fusionsproteine nicht eigenständig in den Zellkern transportiert wurden, sondern hierfür ihr natives Pendant, demnach das native TcsC bzw. NikA, im Sinne einer Shuttlefunktion dieser Proteine benötigten. Diese Art einer Dimerisierung ist für Gruppe III-HHKs bereits beobachtet worden (KAUR *et al.*, 2014). Studien mit den Deletionsmutanten AfS35  $\Delta tcsC$  und A26  $\Delta nikA$ , welche kein natives TcsC bzw. NikA exprimieren, zeigten jedoch, dass sich die Fusionsproteine GFP-TcsC und GFP-NikA dort ebenfalls im Zellkern befinden. Für den Transport der Fusionsproteine in den Zellkern ist demnach keine Interaktion mit einem nativen TcsC- bzw. NikA-Molekül vonnöten.

Die Lokalisation von TcsC und NikA im Zellkern einer Hyphe stellt eine interessante Erkenntnis dar. Gemäß ihrer Funktion als Sensorproteine erwartet man deren Lokalisation eher in direkter Nähe zur externen Umgebung, demnach am ehesten als Membranproteine. Anlass zu dieser Annahme gibt beispielsweise der Blick auf das Protein SLN1p der Hefe *S. cerevisiae*, welches dort äquivalent zu TcsC in *A. fumigatus* und NikA in *A. nidulans* den HOG-Signalweg reguliert und dank transmembranösen Domänen in der Zellmembran verankert ist (TAO *et al.*, 2002). Desweiteren ergab eine Analyse der Proteinsequenz von TcsC Hinweise auf eine potentielle Transmembrandomäne, was erneut für eine Lokalisation des Proteins in der Zellmembran sprechen würde (GRICE *et al.*, 2013). Um herauszufinden, wodurch die unerwartete Lokalisation von TcsC und NikA im Zellkern bedingt wird, wurden deren Proteinsequenzen genauer untersucht. Die Proteinsequenz ist ein wichtiger Faktor für den Transport eines Proteins in den Zellkern. Im Zellkern ist die genetische Information des Organismus in Form der DNS zu finden, weshalb dieser geschützt und der Eintritt in den Zellkern gut überwacht ist. Proteine können nur durch den sogenannten *nuclear pore complex* (NPC) in den Kern gelangen (FELDHERR *et al.*, 1984; OSMANI *et al.*, 2006). Kleine Proteine (unter 30 kDa) können passiv durch die Kernporen diffundieren, größere Moleküle benötigen jedoch einen aktiven Transport (HUNTER *et al.*, 2014). Der Transport von Molekülen in den Zellkern ist ein streng regulierter Vorgang, wobei die Proteine bestimmte Peptidstrukturen aufweisen müssen, die

von Transport-Molekülen am NPC erkannt werden. Nur dann findet der Transport in den Kern statt. Diese Erkennungssignale werden durch sogenannte *nuclear localization sequences* (NLSs) codiert und zeichnen sich in der Proteinsequenz als spezifische Motive ab. Nicht selten beinhaltet die NLS eine Reihe positiv geladener (basischer) Aminosäuren wie Lysin (K) und Arginin (R) (JANS *et al.*, 2000; AL ABDALLAH *et al.*, 2012; HUNTER *et al.*, 2014). Es lag deshalb das Augenmerk der darauffolgenden Untersuchungen auf der Ermittlung der Sequenzmotive, die den Eintritt von TcsC bzw. NikA in den Zellkern ermöglichen.

Es war bereits bekannt, dass ein um die ersten 208 N-terminalen Aminosäuren verkürztes TcsC-Protein im Zytoplasma lokalisiert ist (SPADINGER & EBEL, 2017). Die Aminosäuresequenz, die essentiell für die Zellkernlokalisation war, lag demnach vermutlich im Bereich von TcsC<sub>1-208</sub> und war durch die Deletion des Bereiches verloren gegangen. Zudem konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass ebenjenes, um seinen N-Terminus verkürztes TcsC-Protein in seiner Aktivität eingeschränkt ist. Dies ergab eine Untersuchung des Stammes AfS35  $\Delta tcsC+tcsC_{HAMP1-6}$ , welcher kein natives TcsC-Protein, sondern lediglich ein um seine 208 N-terminalen Aminosäuren verkürztes TcsC-Protein (TcsC<sub>210-1337</sub>) exprimiert. Die Durchführung eines Tüpfeltests, bei dem durch Sorbitol hyperosmolarer Stress auf die untersuchten Pilzstämme ausgeübt wurde, zeigte, dass sich AfS35  $\Delta tcsC+tcsC_{HAMP1-6}$  schlechter an die hyperosmolaren Bedingungen anpassen konnte, als die Stämme AfS35 oder AfS35  $\Delta tcsC+gfp-tcsC$ . Der N-Terminus von TcsC scheint demnach wichtige Informationen zu beinhalten, die die Aktivität und Lokalisation des Proteins beeinflussen.

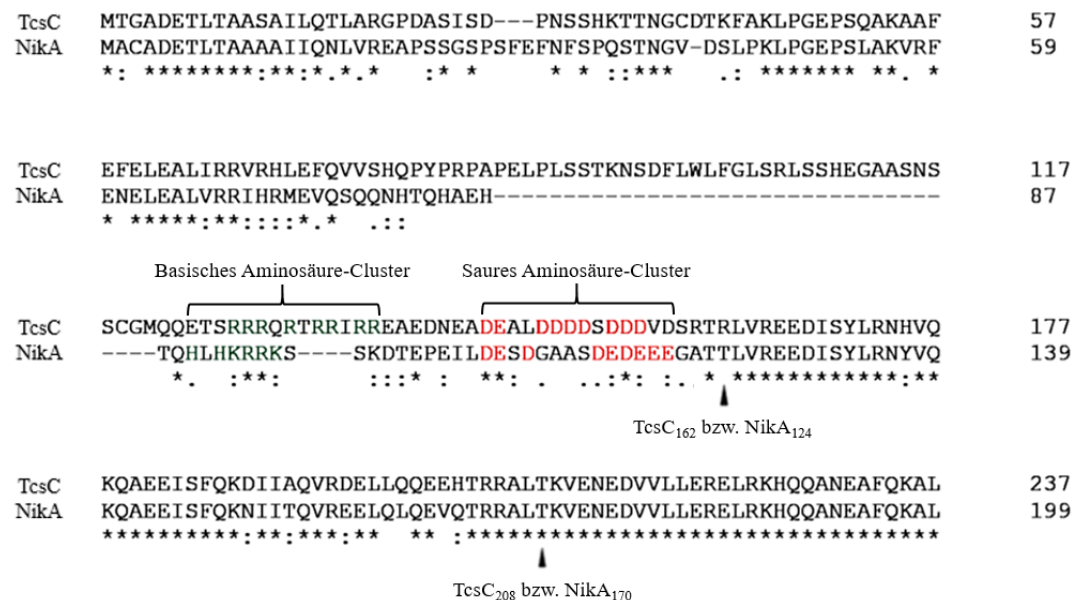
Diese Erkenntnisse gaben den Anlass, die Proteinsequenzen der N-Termini von TcsC und NikA eingehender zu untersuchen. Es wurde vorerst ein Konstrukt erstellt, welches den N-Terminus von TcsC (TcsC<sub>1-208</sub>) als GFP-Fusionsprotein im *A. fumigatus*-Stamm AfS35 exprimiert. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung konnte dokumentiert werden, dass GFP-TcsC<sub>1-208</sub> im Zellkern lokalisiert ist. Bei einem Aminosäuresequenz-Alignment von TcsC und NikA konnten anschließend die ersten 170 N-terminalen Aminosäuren von NikA als Gegenstück zum N-Terminus von TcsC identifiziert werden. Es wurde zudem ersichtlich, dass die N-Termini der beide Proteine eine deutlich geringere Homologie aufweisen, als die Gesamtproteine. TcsC und NikA weisen in ihrer

gesamten Proteinsequenz 87 % identische Aminosäuren auf. Für die Aminosäuren TcsC<sub>1-208</sub> und NikA<sub>1-170</sub> liegen dagegen lediglich 45 % identische Aminosäuren vor. Somit stellte sich die Frage, ob die Erkenntnis, dass sich das für die Zellkernlokalisierung von TcsC verantwortliche Sequenzmotiv im N-Terminus befindet, überhaupt auf NikA übertragbar war. Die geringe Homologie der Proteine in diesem Bereich könnte bedeuten, dass sich die NLS bei NikA in einem anderen Bereich der Proteinsequenz befindet. Die Konstruktion eines auf den N-Terminus reduzierten NikA-Proteins und die darauffolgende Expression als GFP-NikA<sub>1-170</sub>-Fusionsprotein im *A. nidulans*-Stamm A26 zeigte jedoch, dass genau wie bei TcsC der N-Terminus von NikA für die Zellkernlokalisierung verantwortlich ist.

Nun konnte die NLS bislang für TcsC auf die Aminosäuren TcsC<sub>1-208</sub> und für NikA auf die Aminosäuren NikA<sub>1-170</sub> eingegrenzt werden. Um diese Kernlokalisierungssignale noch weiter eingrenzen zu können, wurden mehrere Teilproteine konstruiert, die das Lokisationsmotiv möglichst genau abbilden sollten. Zunächst wurde mit der Herstellung der Teilproteine TcsC<sub>1-109</sub> und TcsC<sub>109-208</sub> der N-Terminus von TcsC halbiert und die beiden Hälften als GFP-Fusionsproteine in AfS35 exprimiert. Keines der beiden Fusionsproteine wies eine Lokalisation im Zellkern auf. Das in TcsC<sub>1-208</sub> vorliegende Muster, das für den Transport in den Zellkern notwendig war, war offenbar durch die Teilung des N-Terminus an Position TcsC<sub>109</sub> verloren gegangen. In AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-109</sub>* lag das Fluoreszenzsignal neben einer gleichmäßigen Verteilung im Zytoplasma noch vereinzelt punktförmig verstärkt vor. Diese Signalverstärkungen konnten keiner distinkten Struktur innerhalb der Hyphe zugeordnet werden und stellten wohl am ehesten eine Fehllokalisierung des manipulierten TcsC-Teilproteins dar. Im Stamm AfS35 *gfp-tcsC<sub>109-208</sub>* war das Fluoreszenzsignal ebenfalls größtenteils zytoplasmatisch, es konnte jedoch zudem eine geringgradige Fluoreszenzmarkierung an Strukturen dokumentiert werden, die vermutlich den Zellkernen entsprachen. Dies könnte bedeuten, dass der Abschnitt TcsC<sub>109-208</sub> zu einem gewissen Ausmaß einen Transport in den Zellkern ermöglicht, jedoch nicht so effizient wie der in ganzer Länge vorliegende N-Terminus TcsC<sub>1-208</sub>. Eine eindeutige Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu den Zellkernen war nicht möglich, da es trotz Durchführung unterschiedlicher Methoden im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht gelungen ist, bei vitalen, nicht fixierten Hyphen eine Zellkernfärbung durchzuführen. Dies war lediglich bei fixierten Präparaten durch den Einsatz von

*Mounting Medium* mit dem Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) möglich. Eine Fixierung der Präparate führte jedoch häufig zu Artefaktbildung bei den Fluoreszenzsignalen der exprimierten GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine, was die Dokumentation einer potentiellen Zellkernlokalisierung erschwerte. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung vitaler Hyphen bedeutet durch eine geringere Einflussnahme auf die Zellen ein deutlich vermindertes Risiko von Artefakten, weshalb diese Methode bevorzugt wurde. Aufgrunddessen wurde auf eine Fixierung der Hyphen und damit auf eine Zellkernfärbung verzichtet.

Nach der Erkenntnis, dass die NLS durch die Halbierung des N-Terminus zumindest größtenteils eliminiert worden war, wurde im Anschluss ein Konstrukt gefertigt, welches den N-Terminus von TcsC nicht halbierte, sondern die Aminosäuren TcsC<sub>1-162</sub> mit GFP fusionierte. Die Aminosäuren TcsC<sub>1-162</sub> wurden mit Bedacht gewählt, da ein Blick auf die Aminosäuresequenz dieses Abschnittes zwei Bereiche mit einer auffälligen Ansammlung saurer bzw. basischer Aminosäuren aufzeigte, die in den sonst nur teilweise homologen N-Termini von TcsC und NikA in sehr ähnlichem Muster vorlagen (siehe Abbildung 88).



**Abbildung 88: Aminosäuresequenz-Alignment von TcsC<sub>1-237</sub> und NikA<sub>1-199</sub>**

Grün: basische Aminosäuren  
 Rot: saure Aminosäuren  
 .: ähnliche Aminosäuren  
 : sehr ähnliche Aminosäuren  
 \* identische Aminosäuren

Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Stammes AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-162</sub>* zeigte, dass das Fusionsprotein GFP-TcsC<sub>1-162</sub> im Zellkern lokalisiert ist. Die für die Zellkernlokalisation verantwortliche NLS konnte damit weiter auf die N-terminale Aminosäuresequenz von TcsC<sub>1-162</sub> eingegrenzt werden. Die Expression eines GFP-Fusionsproteins bestehend aus den zu TcsC<sub>1-162</sub> homologen Aminosäuren NikA<sub>1-124</sub> (siehe Abbildung 88) in A26 veranschaulichte zudem, dass auch in NikA die N-terminale Proteinssequenz inklusive der auffälligen Ansammlung geladener Aminosäuren zu einer Zellkernlokalisation führt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der zu Beginn erläuterten Tatsache, dass nukleäre Translokationsdomänen häufig durch geladene Aminosäuren vermittelt werden, wobei es sich hierbei größtenteils um basisch geladene Aminosäuren handelt. Es konnte allerdings auch festgestellt werden, dass die NLS nicht auf das basische Aminosäure-Cluster von TcsC<sub>127-137</sub> beschränkt werden kann, denn der Versuch, die NLS von N-terminaler Seite noch weiter einzugrenzen, führte zu einem Verlust der Zellkernlokalisation. Die verkürzte Proteinsequenz TcsC<sub>87-162</sub> ergab als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert ein zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal. Die ersten N-terminalen 87 Aminosäuren von TcsC sind demnach genauso essentiell für die Zellkernlokalisation des Proteins, wie die Aminosäuresequenz bis zu TcsC<sub>162</sub>. Auch das Teilprotein TcsC<sub>109-208</sub> war größtenteils im Zytoplasma lokalisiert und rief nur eine geringgradige Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne hervor. Somit war ersichtlich, dass das basische Aminosäure-Cluster von TcsC<sub>127-137</sub> zwar essentiell für die Zellkernlokalisation ist, der N-terminale Abschnitt vor diesen Aminosäuren jedoch auch eine wichtige Rolle spielt. Es könnte also sein, dass die NLS in TcsC aus mehreren Motiven besteht, die für sich alleine nicht für eine eindeutige Zellkernlokalisation ausreichen, sondern nur in Kombination ihre Wirkung entfalten. Um diese Erkenntnisse besser verstehen zu können, wurde die Aminosäuresequenz des N-Terminus von TcsC mithilfe von zwei unterschiedlichen Online-Tools auf Vorhersagen zu möglichen NLS hin untersucht. Das Programm NucPred des *Stockholm Bioinformatics Center* (<https://nucpred.bioinfo.se/nucpred/>) prognostizierte eine NLS im Bereich der Aminosäuren TcsC<sub>127-129</sub>. Die positive Einflussnahme dieses Sequenzbereiches auf die Zellkernlokalisation von TcsC war, wie zuvor erläutert, bereits vermutet worden und konnte durch weitere Untersuchungsergebnisse untermauert werden.

Um die Bedeutung des basischen Aminosäure-Clusters in einem weiteren Experiment zu bestätigen, wurde ein Konstrukt erstellt, in welchem die Aminosäuren TcsC<sub>127-137</sub> im N-Terminus von TcsC fehlten. Die Proteinsequenz TcsC<sub>1-208</sub><sup>( $\Delta$ 127-137)</sup> wurde als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert. Das Fusionsprotein war im Zytoplasma lokalisiert. Dieses Untersuchungsergebnis bestätigt, dass das Cluster basisch geladener Aminosäuren im Bereich von TcsC<sub>127-137</sub> eine wichtige Rolle bei der Zellkernlokalisation des Proteins spielt. Untermauert wurde diese Erkenntnis durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des zeitgleich hergestellten Stammes AfS35 *tcsC*<sub>1-208</sub><sup>( $\Delta$ 145-158)</sup>-gfp, in dem nicht das Cluster basisch geladener, sondern das Cluster sauer geladener Aminosäuren deletiert wurde. Das Fluoreszenzsignal war in diesem Stamm im Zellkern lokalisiert. Die sauer geladenen Aminosäuren waren demnach kein wichtiger Bestandteil der NLS im N-Terminus von TcsC. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bereits zu Beginn erläuterten Tatsache, dass eine NLS in der Regel aus basischen Aminosäuren besteht. Um die Sensibilität der NLS zu testen, wurde darauffolgend nicht das gesamte basische Aminosäure-Cluster deletiert, sondern lediglich eine einzelne darin enthaltene Aminosäure substituiert. An Position TcsC<sub>129</sub> wurde die basisch geladene Aminosäure Arginin (R) durch die sauer geladene Asparaginsäure (D) ersetzt. Die Substitution R zu D wurde gewählt, da sich das native Basentriplett CGT an Position TcsC<sub>129</sub> gut in das Basentriplett GAT, codierend für Asparaginsäure, umwandeln lässt und dadurch eine Ladungsverschiebung innerhalb der Ansammlung basischer Aminosäuren erreicht wurde. Die Aminosäuresubstitution führte dazu, dass sich TcsC nicht mehr im Zellkern befand. Diese Mutation zeigte, dass die für den Eintritt in den Zellkern verantwortliche Aminosäuresequenz im Bereich des basischen Clusters sehr spezifisch ist und bereits die Substitution einer einzelnen Aminosäure zum Verlust der Zellkernlokalisation des Proteins führt. Nachdem bewiesen war, dass das basische Aminosäure-Cluster im Bereich von TcsC<sub>127-137</sub> essentiell für die distinkte Lokalisation des Proteins im Zellkern ist, wurde die Untersuchung des N-Terminus auf homologe Proteine von TcsC ausgeweitet. Ein Aminosäuresequenzvergleich diverser Gruppe III-HHKs zeigte, dass das N-terminale Cluster basischer Aminosäuren bei zu TcsC homologen Proteinen anderer *Aspergillus* spp. zwar nicht in seiner Sequenz identisch konserviert vorliegt, jedoch die Ansammlung basischer Aminosäuren bei allen untersuchten Proteinen nachzuvollziehen war (siehe Anhang Abbildung A 1). Studien am Protein NikA aus *A. nidulans* erwiesen zudem, dass

eine Manipulation des basischen Aminosäure-Clusters (hier NikA<sub>92-96</sub>) genau wie bei TcsC einen negativen Einfluss auf die Zellkernlokalisierung des Proteins hat. Sowohl die Deletion der positiv geladenen Aminosäuren als auch die Substitution einer einzelnen Aminosäure an Position NikA<sub>94</sub> im Bereich des basischen Aminosäure-Clusters führte zu einem Verlust der Zellkernlokalisierung des Proteins. Hier konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl die Substitution der basisch geladenen nativen Aminosäure Arginin (R) in die sauer geladene Glutaminsäure (E) als auch die Substitution in das ungeladene Alanin (A) zu einer zytoplasmatischen Lokalisation führte. Die NLS scheint demnach ein sehr spezifisches Muster zu sein, das bereits durch geringfügige Ladungsverschiebungen eliminiert wird.

Nun war hinreichend bewiesen worden, dass das Cluster basischer Aminosäuren essentiell für die Zellkernlokalisierung ist. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, welche Aminosäuren im N-terminalen Bereich vor diesem Cluster einen Teil der NLS ergaben. Das Programm NucPred prognostizierte keine weitere NLS neben den Aminosäuren des basischen Clusters. Die erarbeiteten Untersuchungsergebnisse hatten jedoch gezeigt, dass dieses basische Cluster isoliert, demnach ohne den N-terminalen Aminosäuren vor dem Bereich, nicht in der Lage war, die Zellkernlokalisierung hervorzurufen. Diesbezüglich konnte die Vorhersage keine Klarheit verschaffen. Die Analyse der Proteinsequenz durch ein anderes Programm zeigte ebenfalls, dass die Vorhersagen solcher Programme nicht unbedingt verlässlich sind. Bei einer Analyse durch das Online-Tool cNLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_y.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_y.cgi)) wurden für die Proteinsequenz von TcsC lediglich für die Aminosäuren TcsC<sub>1007-1033</sub> und TcsC<sub>1162-1213</sub> putative NLSs vorausgesagt. Es konnte jedoch bereits von Spadinger & Ebel (2017) sowie erneut in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich von TcsC nicht für die Zellkernlokalisierung des Proteins verantwortlich ist. Diese Lokalisation wird ausschließlich durch den N-Terminus bedingt. Zu bedenken ist bei diesem Analyseergebnis allerdings, dass das Programm cNLS Mapper auf Untersuchungen an Hefen basiert. Die Genauigkeit der Vorhersage kann deshalb bei *Aspergillus* spp. vermindert sein. Insgesamt kann festgehalten werden, dass Vorhersagen über putative NLSs auf Basis einer Aminosäuresequenz-Analyse nur Hinweise geben können, jedoch kein als eindeutig zu bewertendes Ergebnis. Im Falle von TcsC erbrachte die Suche nach

einer NLS im N-Terminus vor dem basischen Aminosäure-Cluster keine weiteren Erkenntnisse.

### 1.2. TcsC transloziert im aktiven Zustand aus dem Zellkern in das Zytoplasma

Neben der Tatsache, dass sich TcsC im inaktiven Zustand im Zellkern befindet, war eine weitere interessante Erkenntnis, dass TcsC im aktiven Zustand den Zellkern verlässt und in das Zytoplasma transloziert. Gezeigt wurde dies anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen der Stämme AfS35 *gfp-tcsC* und AfS35 *gfp-tcsC+rfp-stuA<sub>C-Terminus</sub>*. Unter hyperosmolarem Stress sowie unter dem Einfluss von Fludioxonil vollzieht das Fusionsprotein GFP-TcsC eine Translokation. Die distinkte Lokalisation im Zellkern weicht dabei einer gleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma sowie einer unscharf abgegrenzten Signalverstärkung in der Zellkernperipherie. Die Lokalisation im Zytoplasma ist jedoch nur transient, nach 70 Minuten Hyperosmolarität konnte das Fluoreszenzsignal in AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC* wieder eindeutig den Zellkernen zugeordnet werden. Untersuchungen eines um seine Kinase-Domäne verkürzten TcsC-Proteins (TcsC<sub>1-746</sub>) zeigten, dass dieses nicht mehr in der Lage war, die bei GFP-TcsC beobachtete Translokation durchzuführen. Der für diese Translokation verantwortliche Proteinabschnitt konnte damit auf den Bereich der Kinase-Domäne (TcsC<sub>747-1337</sub>) eingegrenzt werden. Nun lag die Vermutung nahe, dass die Aktivität der Kinase-Domäne von TcsC die Translokation des Proteins bedingte. Um diese Theorie zu testen, folgten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Stammes AfS35 *gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup>*. In AfS35 *gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup>* wurde das Kinase-Modul von TcsC durch die Substitution der Aminosäure TcsC<sub>771</sub> manipuliert. Der Aminosäure TcsC<sub>771</sub> wird eine wichtige *receiver*-Funktion zugeschrieben, wobei der an dieser Position vorliegende Histidinrest im Zuge der Aktivierung von TcsC autophosphoryliert wird. Eine Substitution der nativen Aminosäure Histidin (H) in Alanin (A) führt der Literatur zufolge zur Inaktivierung des Kinase-Moduls. Dies wurde daran festgemacht, dass die Mutation H771A in der Kinase-Domäne von TcsC in *A. fumigatus* unter dem Einfluss von Fludioxonil zu einem Ausbleiben des Stressphänotyps führt (SPADINGER & EBEL, 2017). Eine im Zuge der vorliegenden Arbeit erfolgte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab jedoch, dass das Fusionsprotein GFP-TcsC<sup>(H771A)</sup> im Gegensatz zu GFP-TcsC<sub>1-746</sub> unter Stresseinwirkung trotz



mutmaßlich inaktiver Kinase-Domäne aus dem Zellkern in das Zytoplasma transloziert. Möglicherweise initiieren also andere Abläufe als die Autophosphorylierung des TcsC-Proteins die Translokation ins Zytoplasma. Alternativ wäre allerdings denkbar, dass die Mutation H771A doch nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der Kinase-Domäne führt.

Im Zusammenhang mit der Translokation von TcsC aus dem Zellkern in das Zytoplasma stand noch ein zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit beobachtetes Untersuchungsergebnis. Im Zuge einer Studie des Stammes AfS35  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$ , der ein an Position TcsC<sub>155</sub> im Cluster negativ geladener (saurer) Aminosäuren des N-Terminus manipuliertes GFP-TcsC-Fusionsprotein exprimiert, konnte festgestellt werden, dass diese Manipulation dazu führte, dass das Protein die Fähigkeit einbüßte, unter dem Einfluss von Fludioxonil aus dem Zellkern ins Zytoplasma zu translozieren. Diese Erkenntnis war völlig unerwartet und zeigt, dass die Vorgänge, die zu einer Translokation aus dem Zellkern führen, komplex sind. Die Proteinsequenz von TcsC wurde nach dieser Beobachtung über das Online-Programm NetNES 1.1 der *Technical University of Denmark* (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5D7E2C9A00004E3F5D666930&wait=20>) auf beinhaltetete *nuclear export signals* (NESs) hin analysiert. Die Analyse sagte für die Aminosäure TcsC<sub>1109</sub> eine Beteiligung an einem NES voraus. Diese Prognose stand im Einklang mit den Untersuchungen des verkürzten TcsC<sub>1-746</sub>-Proteins, welches durch den Verlust des Kinase-Moduls (TcsC<sub>747-1337</sub>) keine Translokation mehr vollziehen konnte, bot jedoch keine Erklärung für den beobachteten Einfluss der Aminosäure TcsC<sub>155</sub> auf die Fähigkeit zur Translokation.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Stamm AfS5  $\Delta tcsC + gfp-tcsC^{(D155H)}$  Auffälligkeiten bei der Anpassungsreaktion auf hyperosmolaren Stress zeigte. Auf mikroskopischer Ebene konnte bei dem Einsatz des Stressors Sorbitol im Gegensatz zu Fludioxonil ein gewisser Grad an Translokation aus dem Zellkern beobachtet werden. Im Unterschied zu der zuvor geschilderten Verteilung des Fluoreszenzsignals von GFP-TcsC unter hyperosmolarem Stress markierte GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> nach 70 Minuten Hyperosmolarität jedoch eine große Anzahl distinkter punktförmiger Strukturen unterschiedlicher Größe im Zytoplasma der Hyphen, die unregelmäßig verteilt vorlagen und vereinzelt mit dem Zellkern assoziiert zu sein schienen. Diese Lokalisation blieb bestehen, GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup>

vollzog im Gegensatz zu GFP-TcsC keine Translokation zurück in den Zellkern. Bei einer Vergleichstudie mit dem Stamm AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup>*, bei dem das Fusionsprotein GFP-TcsC<sup>(R129D)</sup> aufgrund der Mutation an Position TcsC<sub>129</sub> im Zytoplasma und nicht im Zellkern vorliegt, konnte dieses Fluoreszenzmuster erneut beobachtet werden. Nach 70 Minuten Sorbitol-Einfluss lag das Fusionsprotein GFP-TcsC<sup>(R129D)</sup> größtenteils gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor, es konnten jedoch zudem wie bei AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC<sup>(D155H)</sup>* distinkte punktförmige Fluoreszenzmarkierungen dokumentiert werden, die allerdings im Vergleich deutlich kleiner und seltener waren. Da im Zuge der vorliegenden Arbeit keine Zellkernfärbung bei vitalen Zellen gelungen ist, konnten die Zellkerne der Hyphen während der geschilderten Studie nicht dargestellt und die punktförmigen Fluoreszenzmarkierungen der Fusionsproteine GFP-TcsC<sup>(D155H)</sup> und GFP-TcsC<sup>(R129D)</sup> nicht mit der Lage der Zellkerne in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise beeinflussen die durchgeführten Mutationen die physiologische Translokation von TcsC zurück in den Zellkern. Alternativ könnte die veränderte Proteinsequenz eine normalerweise nicht mögliche Protein-Protein-Interaktion mit im Zytoplasma befindlichen Proteinen begünstigen und dabei zu einer Fixierung der Fusionsproteine im Zytoplasma führen. Die Signalverstärkungen im Zytoplasma wären damit Artefakte einer Fehllokalisation der mutierten Fluoreszenzproteine. Es kann allerdings festgehalten werden, dass die bei einem unmutierten TcsC-Protein nicht zu beobachtende Bindung an Strukturen im Zytoplasma keine Aktivitätsinhibierung bei TcsC<sup>(D155H)</sup> oder TcsC<sup>(R129D)</sup> hervorruft. Die Stämme AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC<sup>(D115H)</sup>* und AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup>* waren im Bezug auf ihr Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen oder unter Fludioxonil-Einfluss durchaus in der Lage Kolonien auszubilden, auch wenn diese morphologisch geringgradig vom Wildtyp abwichen. Das Fehlverhalten der mutierten TcsC-Proteine führt demnach nicht zu einem vollständigen Funktionalitätsverlust.

Was bedeutet es nun, dass die HHK TcsC in ihrem inaktiven Zustand im Zellkern lokalisiert ist? Wodurch wird deren Translokation in das Zytoplasma hervorgerufen? Üblicherweise finden Translokationen von Proteinen in umgekehrter Richtung, also aus dem Zytoplasma in den Zellkern statt. Die Vorteile hierbei sind, dass ein Protein durch seine zytoplasmatische Lokalisation leichter die Information membranständiger Sensoren erhalten kann und somit schnell auf

externe Stressoren reagieren kann. Außerdem ist durch eine Translokation in den Zellkern im Zuge der Anpassung an die Stresssituation der Einfluss des Proteins auf die Genexpression des Organismus vereinfacht. Beispielhaft für eine solche Translokation ist das Protein SakA aus *A. fumigatus*, welches nach Aktivierung in den Zellkern transloziert (BRUDER NASCIMENTO *et al.*, 2016). Weshalb also befindet sich TcsC im inaktiven Zustand nicht ebenfalls im Zytoplasma und wie erhält es die Information über den Einfluss eines externen Stressors? Denkbar wären mechanische Reize wie ein durch hyperosmolaren Stress hervorgerufene Reduktion des zytoplasmatischen Volumens, wobei Wasser aus dem Zytoplasma entlang des osmotischen Gefälles in die hyperosmolare Umgebung der Hyphe entweicht. Die Zellkerne könnten durch das Schrumpfen des zytoplasmatischen Raumes mit verformt werden und TcsC könnte diesen Reiz wahrnehmen. In humanen Zellen ist das Phänomen der Zellkernverformung im Zusammenhang mit Anpassungsreaktionen auf hyper- und hypoomotischen Druck bereits untersucht worden. Mechanischer Stress wie das Schrumpfen des Zytoplasmas unter externen hyperosmotischen Verhältnissen kann durch biophysische Mechanismen auf direktem Weg Einfluss auf den Zellkern und das Genom ausüben (FINAN & GUILAK, 2010).

Das Phänomen der Translokation eines Proteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma ist an sich nicht unbekannt. In der Literatur wurde bereits eine Reihe anderer Proteine beschrieben, die dieses Verhalten zeigen. Eines davon stellt das Protein CBF5p aus *S. cerevisiae* dar. CBF5p verlässt in der Bäckerhefe unter hyperosmolarem Stress den Zellkern und wandert in das Zytoplasma aus, genau wie TcsC in *A. fumigatus* (NANDURI & TARTAKOFF, 2001). Das Protein spielt jedoch keine funktionelle Rolle bei der Anpassung an die hyperosmolaren Bedingungen. Die Translokation von CBF5p könnte vielmehr ein Indiz dafür sein, dass unmittelbar nach dem Einsetzen von hyperosmolarem Stress die Kontrollmechanismen an den Kernporen vermindert effizient sind. Es sollte im Zuge der Arbeiten an TcsC untersucht werden, ob ein zu CBF5p homologes Protein in *A. fumigatus* vorkommt und ob das in *S. cerevisiae* beobachtete Verhalten von CBF5p auf *A. fumigatus* übertragbar war. Stellt es dort neben TcsC ein weiteres Protein dar, welches unter hyperosmolarem Stress eine Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma vollzieht? Um dies in Erfahrung zu bringen, wurde vorerst das zu CBF5p homologe Protein in *A. fumigatus* über die

*Aspergillus Genome Database* identifiziert, als Af-Cbf5 bezeichnet und dann als GFP-Fusionsprotein hinsichtlich seiner Lokalisation und Translokationsverhalten untersucht. Af-Cbf5 ist in *A. fumigatus* wie CBF5p in *S. cerevisiae* im Zellkern lokalisiert, unterscheidet sich jedoch von seinem homologen Protein in der Bäckerhefe dadurch, dass es unter hyperosmolarem Stress nicht aus dem Zellkern in das Zytoplasma transloziert, sondern im Zellkern verbleibt. Die in der Studie von Nanduri und Tartakoff (2001) über CBF5p gewonnenen Erkenntnisse sind somit nicht auf Af-Cbf5 übertragbar. Die von TcsC in *A. fumigatus* unter hyperosmolarem Stress vollzogene Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma scheint daher für dieses Protein spezifisch zu sein. Eine transiente Effizienzverminderung der Kontrollen an den Kernporen nach Einsetzen von hyperosmolarem Stress liegt daher nicht vor. Die Aktion wird offenbar anderweitig kontrolliert, als vergleichbare Translokationen in der Bäckerhefe. Mit StuA<sub>C</sub>-Terminus wurde in dieser Arbeit zudem noch mit einem weiteren nukleären Teilprotein gearbeitet, welches unter dem Einfluss externer Stressoren seine Position im Zellkern beibehält. Es scheint demnach bei *A. fumigatus* nicht allzu häufig vorzukommen, dass Proteine wie TcsC aus dem Zellkern in das Zytoplasma translozieren.

### **1.3. Die Überexpression eines GFP-TcsC-Fusionsproteins wirkt sich negativ auf die Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress aus**

Der Studienaufbau der im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen basierte auf der Annahme, dass die Expression eines GFP-TcsC-Fusionsproteins keine Auswirkungen auf die physiologische Aktivität des nativen TcsC-Moleküls hat. Bisherige Versuche und Veröffentlichungen ergaben diesbezüglich keinen Hinweis. Es wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit ein negativer Einfluss des GFP-TcsC-Fusionsproteins auf die Anpassungsfähigkeit des exprimierenden Organismus an hyperosmolaren Stress erkannt. Beobachtet wurden diese Adaptionsschwierigkeiten bei Tüpfeltests, die Stämme mit GFP-TcsC-Überexpression mit dem Wildtyp AfS35 verglichen. Die Stämme AfS35 *gfp-tcsC* und AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* verhielten sich untereinander identisch und zeigten unter hyperosmolarem Stress eine geringgradig verminderte Koloniegröße im Vergleich zu AfS35. Hinsichtlich der Sporulation konnte unter hyperosmolaren und mehr noch unter physiologischen Bedingungen der Unterschied festgestellt werden, dass die Stämme AfS35 *gfp-tcsC* und AfS35  $\Delta tcsC$  + *gfp-tcsC* einen weißen Randsaum aus nicht sporulierenden Lufthyphen ausbildeten. Dahingehend glichen

die Stämme eher dem Phänotyp einer *ΔtcsC* Mutante (MCCORMICK *et al.*, 2012). Interessanterweise war der Stamm AfS35 *tcsC*, der nicht das Fusionsprotein GFP-TcsC, sondern lediglich das Protein TcsC überexprimiert, weder unter physiologischen noch unter hyperosmolaren Bedingungen von dem Wildstamm AfS35 zu unterscheiden. Das überexprimierte GFP-TcsC-Fusionsprotein scheint demnach eine gewisse negative Wirkung auf das Wachstum der Kolonien auszuüben und das sowohl unter hyperosmolarem Stress als auch unter physiologischen Bedingungen. Ein Tüpfeltest mit Fludioxonil zeigte jedoch, dass sich bezüglich diesen Stressors die Stämme AfS35, AfS35 *tcsC* und AfS35 *gfp-tcsC* einheitlich verhielten. Keiner der Stämme konnte auf mit Fludioxonil versetztem Agar wachsen. Die negative Wirkung des GFP-TcsC-Moleküls scheint demnach nicht unbedingt eine negative Beeinflussung der Aktivität von TcsC zu sein. Dies lässt sich auch daran ablesen, dass der Stamm AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC* genau dieselben Adaptionsschwierigkeiten an hyperosmolaren Stress hatte, wie der Stamm AfS35 *gfp-tcsC*. Die Problematik, die das überexprimierte GFP-TcsC-Fusionsprotein auslöst, kann demnach nicht direkt mit einer Einschränkung der Aktivität des nativen TcsC-Proteins erklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre allerdings eine Kombination aus mehreren Beeinflussungen. Es könnte sein, dass die Überexpression von GFP-TcsC das native TcsC-Protein, falls vorhanden, durch Interaktionen in seiner Funktionalität beeinträchtigt. Dies könnte durch Vorgänge wie eine Konkurrenz an potentiellen Bindungsstellen oder eine Dimerisierung vonstattengehen. Die Überexpression eines im Zellkern lokalisierten Fusionsproteins bestehend aus GFP und dem verkürzten TcsC-Protein TcsC<sub>1-286</sub>, welches die Sequenz des N-Terminus inklusive der ersten HAMP-Domäne darstellt, zog keine der bei GFP-TcsC beobachteten Beeinträchtigungen nach sich. Der Stamm AfS35 *gfp-tcsC<sub>1-286</sub>* verhielt sich sowohl unter physiologischen als auch unter hyperosmolaren Bedingungen genau wie der Wildtyp. Der negative Einfluss von GFP-TcsC wird demnach eher nicht von der Tatsache hervorgerufen, dass ein stark exprimiertes GFP-Fusionsprotein im Zellkern vorliegt. Der Tatsache zufolge, dass der Stamm AfS35 *tcsC* mit seinem überexprimierten TcsC-Molekül ebenfalls keinen Stressphänotyp unter hyperosmolaren Bedingungen ausbildet, scheint allerdings auch eine unphysiologisch hohe Anzahl an TcsC-Molekülen im Zellkern nicht für den beobachteten Stressphänotyp verantwortlich zu sein. Dieser muss vielmehr speziell mit GFP-TcsC in Zusammenhang stehen. Eventuell ist das TcsC-Protein innerhalb

des GFP-Fusionsproteins vermindert aktiv und übt sowohl in einer *AtcsC* Mutante als auch in einem TcsC exprimierenden Stamm einen dominant negativen Einfluss auf die Anpassungsfähigkeit an hyperosmolare Bedingungen aus. Dass der Stamm AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC*, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, sensibel gegenüber Fludioxonil ist, zeigt, dass der negative Effekt der GFP-TcsC-Überexpression nur bei der physiologischen Aktivität von TcsC, der Anpassung an hyperosmolaren Stress, auftritt. Am ehesten findet eine Kombination verschiedener Einflüsse statt, die sich gemeinsam zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit des betroffenen Stammes potenzieren.

Die beschriebenen Tests bildeten bislang nur die makroskopischen Veränderungen durch hyperosmolaren Stress ab. Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurden die Anpassungsreaktionen auf hyperosmolaren Stress zusätzlich auf mikroskopischer Ebene analysiert. Eine unphysiologische Reaktion auf hyperosmolares Medium zeigte sich dort durch ein deutliches Schrumpfen des zytoplasmatischen Raumes mit einer Ablösung der Zellmembran von der Zellwand. Dieser Stressphänotyp tritt beim Wildtyp nicht und bei einer *AtcsC* Mutante nur in abgeschwächter Form auf. Zuerst beobachtet wurde er bei einer mikroskopischen Untersuchung des Stammes AfS35 *gfp-tcsC* unter dem Einfluss des Stressors Sorbitol. In diesem Stamm wird das GFP-TcsC-Fusionsprotein über einen *gpdA*-Promoter in hoher Rate überexprimiert. Um festzustellen, ob die beobachtete verminderte Anpassungsfähigkeit des Stammes an Sorbitol durch die Überexpression von GFP-TcsC hervorgerufen wird, wurde zum Vergleich ein Referenzstamm mit der Bezeichnung AfS35 *gfp-tcsC<sup>natPro</sup>* hergestellt. Dieser Stamm exprimiert das Fusionsprotein GFP-TcsC nicht über einen *gpdA*-Promoter, sondern über den nativen Promoter von *tcsC*, welcher deutlich schwächer ist (persönliche Mitteilung von Prof. Frank Ebel). Dadurch konnte der Einfluss des Fusionsproteins GFP-TcsC auf die Anpassungsfähigkeit des Stammes an hyperosmolaren Stress bei physiologischer Expressionsrate dokumentiert werden. Mithilfe des nativen *tcsC*-Promoters wurde GFP-TcsC in AfS35 exprimiert und der neu generierte Stamm in einer mikroskopischen Untersuchung mit AfS35 *gfp-tcsC*, dem Wildstamm AfS35 sowie AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC* verglichen. Im Gegensatz zu den Stämmen AfS35 *AtcsC* + *gfp-tcsC* und AfS35 *gfp-tcsC* bildet AfS35 *gfp-tcsC<sup>natPro</sup>* unter Sorbitol-Einfluss keinen Stressphänotyp aus. Diese Beobachtung spricht dafür, dass speziell die Überexpression von GFP-TcsC

problematisch ist. Der bei AfS35 *ΔtcsC* + *gpf-tcsC* und AfS35 *gfp-tcsC* zu beobachtende Stressphänotyp war allerdings transient. Die Hyphen beider Stämme zeigten direkt nach Zugabe von Sorbitol ein deutliches Zusammenschrumpfen des zytoplasmatischen Raumes, konnten sich jedoch innerhalb von 60 Minuten erholen und ihren physiologischen Zustand wiederherstellen.

Es deutete demnach alles darauf hin, dass die Beeinträchtigung durch das überexprimierte GFP-TcsC-Fusionsprotein nur vorübergehend war. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Anpassungsreaktion an hyperosmolaren Stress möglicherweise auf mehreren Wegen stattfindet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stresseinwirkung in Kraft treten. Hinweise darauf liefert eine Studie an *Neurospora crassa*. In dieser Spezies wird die Anpassungsreaktion an Hyperosmolarität genau wie in *Aspergillus* spp. durch den HOG-Signalweg koordiniert. Mit Os-1 besitzt *N. crassa* zudem ebenfalls eine Gruppe III-HHK (ALEX *et al.*, 1996). Somit könnten die bei dieser Spezies gewonnenen Erkenntnisse als Modell für Anpassungsreaktionen in *A. fumigatus* dienen. Eine an *N. crassa* durchgeführte Studie befasste sich mit den physiologischen Abläufen unter hyperosmolarem Stress. Es konnte beobachtet werden, dass innerhalb der ersten 10 – 20 Minuten nach Verschiebung des osmotischen Gradienten ein Influx von Ionen in das Zytoplasma erfolgt. Nach ca. 20 Minuten wurde dieser Ionen-Influx von einer verstärkten intrazellulären Bildung des osmotisch wirksamen Teilchens Glycerin abgelöst (LEW & LEVINA, 2007; LEW & NASSERIFAR, 2009). In der Annahme, dass sich die Gruppe III-HHK TcsC in *A. fumigatus* vergleichbar mit Os-1 in *N. crassa* verhält, könnte der beobachtete Stressphänotyp das Zeichen einer inhibitorischen Wirkung von GFP-TcsC auf einen durch TcsC vermittelten Ionen-Influx als erste Anpassungsreaktion der Hyphen auf ihre hyperosmolare Umgebung sein. Wird zudem angenommen, dass dieser Ionen-Influx in *A. fumigatus* bis zu einer Stunde anhält, wäre eine Inhibition dieses Anpassungsmechanismus durch GFP-TcsC eine mögliche Erklärung für den bei Stämmen mit GFP-TcsC-Überexpression hervorgerufenen, transienten Stressphänotyp. Erst das Einsetzen der durch den HOG-Signalweg vermittelten Glycerin-Produktion als Antwort auf den hyperosmolaren Stress würde bei diesen Stämmen den Wasserhaushalt der Hyphen regulieren. Um diese Theorie zu testen, wären weitere Untersuchungen nötig, die aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt wurden. Die erläuterten Erkenntnisse bieten hiermit einen Ausgangspunkt für

mögliche Folgeprojekte.

Da der auf mikroskopischer Ebene zu beobachtende Stressphänotyp sowohl bei AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC* als auch bei AfS35 *gfp-tcsC* auftrat, konnte der negative Einfluss von GFP-TcsC nicht ausschließlich auf eine verminderte Funktionalität des nativen TcsC-Proteins zurückgeführt werden. Dass der Effekt nur bei starker Expression von GFP-TcsC auftritt, könnte jedoch bedeuten, dass das Fusionsprotein das native TcsC-Protein neutralisiert und zusätzlich negative Auswirkungen auf die Anpassungsreaktion hat. Um einschätzen zu können, wie stark die Anpassungsreaktion auf Sorbitol von TcsC abhängt, wurde der Stamm AfS35 *ΔtcsC* untersucht. Durch die Deletion des nativen *tcsC*-Gens können hier nur Anpassungsreaktionen an hyperosmolaren Stress ablaufen, die von TcsC unabhängig sind. Der Stressphänotyp der *ΔtcsC* Mutante war auf mikroskopischer Ebene nicht bei allen Hyphen einheitlich. Bereits vor dem Einsatz des Stressors Sorbitol konnte festgestellt werden, dass sich einige der Hyphen unregelmäßig verdickt, wellig und apikal stark abgerundet darstellten. Viele zeigten jedoch auch die für *A. fumigatus* typische schlanke, gerade Hyphenmorphologie. Unter hyperosmolarem Stress bildete sich ebenfalls kein einheitlicher Stressphänotyp aus. Zum Teil war ein deutliches, transientes Schrumpfen des Zytoplasmas zu beobachten, ähnlich dem Stressphänotyp bei GFP-TcsC-Überexpression. Zum Teil konnten sich die Hyphen allerdings auch sehr gut an das hyperosmolare Medium anpassen. Diese zeigten nur einen sehr gering ausgeprägten Stressphänotyp mit nur minimaler Volumenreduktion des Zytoplasmas. Es ist unklar, ob der erste Anpassungsschritt an eine hyperosmolare Umgebung, der Ionen-Influx, vom HOG-Signalweg gesteuert wird. Dieser ist jedoch aufgrund der ablaufenden katalytischen Vorgänge in der Enzymkaskade, den Translokationen beteiligter Proteine zwischen Zellkern und Zytoplasma und der Expression neuer Proteine eine Anpassungsreaktion, die etwas Zeit in Anspruch nimmt. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass innerhalb von Sekunden ablaufende Reaktionen wie ein durch membranständige Ionenkanäle vermittelter Ionen-Influx vom HOG-Signalweg gesteuert werden, zumal sich TcsC zu diesem Zeitpunkt noch im Zellkern befindet. Der sekundenschnelle Einfluss eines im Zellkern lokalisierten TcsC-Moleküls auf membranständige Ionenkanäle ist schwer vorstellbar. Es handelt sich bei dem Ionen-Influx daher vermutlich eher um eine vom HOG-Signalweg unabhängige erste Anpassungsreaktion auf hyperosmolaren



Stress. In einer *AtcsC* Mutante würde diese Reaktion auch ablaufen und in den ersten Minuten helfen, den physiologischen Zustand aufrecht zu erhalten. Längerfristig muss der Ionen-Influx dann aber durch die vermehrte Glycerin-Synthese abgelöst werden. Dass dies ohne den Einfluss von TcsC, und damit ohne dem HOG-Signalweg, nicht stattfindet, erklärt den Stressphänotyp von AfS35 *AtcsC* bei Tüpfeltests auf hyperosmolarem Agar.

Wie genau die Überexpression von GFP-TcsC den Ionen-Influx inhibiert, ist bisher unklar, zumal GFP-TcsC im Zellkern lokalisiert ist, die beteiligten Ionenkanäle dagegen in der Zellmembran. Wo genau TcsC in einer Hyphel lokalisiert ist, kann ebenfalls noch nicht mit absoluter Gewissheit gesagt werden. Für GFP-TcsC ist die Lokalisation jedoch eindeutig bewiesen worden. Idealerweise sollte das Fusionsprotein GFP-TcsC die gleiche Funktionalität haben, wie TcsC. Damit könnte die Lokalisation des Fusionsproteins auf TcsC übertragen werden. Den erarbeiteten Untersuchungsergebnissen zufolge kann deshalb für TcsC derzeit lediglich die Vermutung ausgesprochen werden, dass es genau wie das Fusionsprotein GFP-TcsC im Zellkern lokalisiert ist.

#### **1.4. Untersuchungen einer möglichen Zielstruktur von Fludioxonil in TcsC**

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse der Funktionsweise des Fungizids Fludioxonil. Dieser Wirkstoff führt durch eine artifizielle Aktivierung des HOG-Signalwegs zu einer Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts, was unter anderem einen sofortigen Wachstumsstopp sowie ein Anschwellen der Zellen nach sich zieht. Die Wirkungsweise von Fludioxonil ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Einem Modell zufolge ist die Aktivität von Gruppe III-HHKs durch ein gewisses Dimerisierungsmuster ihrer HAMP-Domänen bedingt (MEENA *et al.*, 2010). Es könnte sein, dass Fludioxonil solche Umlagerungsprozesse induziert. Bei einer kürzlich veröffentlichten Studie über Drk1, die Gruppe III-HHK der Pilzspezies *Blastomyces dermatitidis*, konnte die Aminosäure Drk1<sub>392</sub> als essentiell für die Wirkung von Fludioxonil charakterisiert werden. Die Mutation C392S ruft bei Drk1 eine Resistenz gegenüber Fludioxonil hervor (BRANDHORST *et al.*, 2019). Es sollte daher untersucht werden, ob die für Drk1 geltenden Ergebnisse auf TcsC übertragbar sind und ob eine vergleichbare Mutation in TcsC eine Fludioxonilresistenz in *A. fumigatus* hervorrufen würde. Dafür wurde vorerst die Proteinsequenz von Drk1 über die

Website des *National Center for Biotechnology Information* ermittelt. Über ein Aminosäuresequenz-Alignment von Drk1 und TcsC wurde die zu Drk1<sub>392</sub> äquivalente Aminosäure von TcsC an Position TcsC<sub>447</sub> identifiziert und im Anschluss die von Brandhorst *et al.* (2019) beschriebene Mutation Drk1<sup>(C392S)</sup> in TcsC nachgeahmt, indem durch einen Austausch des Basentriplets TGC in TCC an Position TcsC<sub>447</sub> der vorliegende Cysteinrest (C) in einen Serinrest (S) umgewandelt wurde. Das mutierte TcsC<sup>(C447S)</sup> wurde als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert und in dem entstandenen Stamm im Anschluss das native *tcsC*-Gen deletiert. Die Mutation wurde als GFP-TcsC-Fusionsprotein exprimiert, da die zuvor erläuterten Daten zeigten, dass dieses Protein für den Effekt von Fludioxonil ausreichend ist und zudem noch seine Lokalisation dokumentiert werden kann. Der Stamm AfS35 *ΔtcsC* + *gfp-tcsC*<sup>(C447S)</sup> wies bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ein zellkernlokalisiertes Fluoreszenzsignal auf. Mittels eines Agardiffusionstests mit dem Stressor Fludioxonil konnte festgestellt werden, dass die von Brandhorst *et al.* (2019) publizierten Daten nicht auf TcsC übertragen werden konnten. Durch die Mutation C447S in TcsC war keine Fludioxonil-Resistenz entstanden.

Brandhorst *et al.* (2019) stellten die These auf, dass die Wirkung von Fludioxonil auf einer Inhibition der Triosephosphat-Isomerase beruht, die wiederum zu einer erhöhten zytosolischen Konzentration an Methylglyoxal führt. Diese erhöhte Methylglyoxal-Konzentration soll dann schlussendlich die Aktivierung der Gruppe III-HHKs bedingen, wobei bei diesen Sensorkinasen spezielle *sentinel*-Cysteinreste für das Erkennen des Stressors verantwortlich sind. Drk1 besitzt insgesamt neun Cysteinreste, wobei neben C392 beispielsweise auch C856 als potentielle Zielstruktur in Frage kommt. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass C392 nicht isoliert, sondern in Kombination mit anderen Cysteinresten als Zielstruktur von Fludioxonil dient (BRANDHORST *et al.*, 2019). Die Proteinsequenz von TcsC weist insgesamt zehn Cysteinreste aus. Aus Zeitgründen wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit keiner dieser weiteren Cysteinreste auf seine Funktion im Zusammenhang mit dem Wirkstoff Fludioxonil getestet. Mithilfe weiterer Studien könnte möglicherweise einer dieser Cysteinreste, oder eine Kombination aus mehreren Cysteinen, als für den Einfluss von Fludioxonil verantwortlich identifiziert werden.

## 2. NimA-Studie

Neben den HHKs TcsC und NikA wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit auch die Kinase NimA genauer studiert. NimA ist eine Ser-/Thr-spezifische Proteinkinase, die sowohl in *A. nidulans* als auch in *A. fumigatus* als homologes Protein vorkommt und durch die Regelung der Mitose für das Zellwachstum essentiell ist. Sie ist in nicht-mitotischen Kompartimenten an den Septen der Hyphen lokalisiert (LU & MEANS, 1994; WIEDEMANN *et al.*, 2016). Es konnte bereits in *A. nidulans* gezeigt werden, dass in einer Hyphe vor dem Auftreten der Mitose die apikalen Kompartimente vorübergehend ihre Septumporen schließen, um sich vom restlichen Zytoplasma der Hyphe zu isolieren. Eingeleitet wird dieser Porenverschluss durch eine Translokation der Kinase NimA von der Septumspore hin in Richtung Zellkernperipherie, wo das Protein während der Mitose an die Spindelkörper bindet (SHEN *et al.*, 2014). Durch den Verschluss der Septumspore wird gewährleistet, dass ausschließlich die Zellkerne des apikalen Hyphenkompartiments in die Mitose eintreten und alle weiteren Zellkerne in der Interphase verbleiben. Im Zuge der Mitose findet auch eine Bildung neuer Septen statt (SHEN *et al.*, 2014). Untersuchungen des homologen Proteins NimA aus *A. fumigatus* zeigten, dass das Protein hier genau wie NimA in *A. nidulans* in unbehandelten wildtypischen Hyphen an den Septen lokalisiert ist. Eine Behandlung mit Fludioxonil führt jedoch dazu, dass NimA seine Position an allen Septen verlässt, wodurch diese verschlossen werden. Die Tatsache, dass Hyphen unter dem Einfluss von Fludioxonil mit einem Verschluss der Septenporen sowie einer vermehrten Septen-Neubildung reagieren (WIEDEMANN *et al.*, 2016), zeigt, dass die Aktivierung des HOG-Signalwegs zu diversen Störungen der Homöostase des Pilzes führt. Unter anderem wird dadurch offensichtlich der Ablauf der Mitose beeinflusst, der von NimA geregelt wird. Die dauerhafte Lokalisation von NimA abseits der Septen könnte durch einen ungeregelten Ablauf von Mitosen in allen Kompartimenten einer Hyphe die unter Fludioxonil-Einfluss zu beobachtende vermehrte Zellkernzahl hervorrufen. Um die Lokalisation von NimA aus *A. fumigatus* besser verstehen zu können, wurde das Protein einerseits auf Aminosäuren-Ebene genauer charakterisiert und andererseits als Fusionprotein im Stamm AfS35 *Arho4* exprimiert. Die *Arho4* Mutante wurde in die Studie mit einbezogen, weil sie nur sehr wenige Septen ausbildet und somit die Lokalisation von NimA abseits seiner üblichen Position an den Septen beobachtet werden

konnte. Es stellte sich heraus, dass sich das NimA-GFP-Fusionsprotein in der *Δrho4* Mutante im Großteil der Hyphen im Zytoplasma befindet. NimA ist demnach meist im Zytoplasma lokalisiert, wenn in den Hyphen keine Septen vorhanden sind. Neben der zytoplasmatischen Fluoreszenz konnte zudem in einzelnen Hyphen eine Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne beobachtet werden. Diese distinkte Lokalisation, die sich als transient herausstellte und nur für kurze Zeit zu beobachten war, könnte den Ablauf einer Mitose an den markierten Zellkernen bedeuten. Dies ist dahingehend interessant, als dass Mitosen physiologischerweise nur in den apikalen Zellkompartimenten einer Hyphe stattfinden und nicht in mittleren Hyphenabschnitten. Die transiente Zellkernmarkierung durch NimA-GFP in der gesamten Länge einer Hyphe von AfS35 *Δrho4* legt die Vermutung nahe, dass das Fehlen der Septen zu einer fehlenden Isolierung der apikalen Zellabschnitte und damit zu einer Verbreitung des Signals zum Eintritt in die Mitose über die gesamte Länge einer Hyphe führt. Es wäre nun in einem weiteren Untersuchungsschritt interessant gewesen, herauszufinden, ob der unphysiologische Ablauf von Mitosen über die gesamte Länge einer Hyphe deren Wachstum beeinträchtigt oder beschleunigt. Dieser Ansatz wurde leider aufgrund von Zeitmangel im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt, könnte aber während eines Folgeprojektes mit Wachstumsstudien an vitalen Pilzhypen zu interessanten Ergebnissen führen.

Der Proteinabschnitt NimA<sub>500-600</sub> konnte als essentiell für die Septum-Lokalisation identifiziert werden. Diese Identifizierung erfolgte durch diverse Manipulationen der Aminosäuresequenz des Proteins wie einer Verkürzung auf die ersten N-terminalen 301 Aminosäuren. Das Fusionsprotein NimA<sub>1-301</sub>-GFP war nicht am Septum lokalisiert, sondern im Zytoplasma. Die Information für die distinkte Lokalisation von NimA war durch die Verkürzung auf die N-terminale Hälfte verloren gegangen. Aufgrund dieses Erkenntnis wurde daraufhin speziell der C-Terminus von NimA weiter untersucht. Die Deletion von 100 C-terminalen Aminosäuren hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins. Das Fusionsprotein NimA<sub>1-601</sub>-GFP war nach wie vor am Septum lokalisiert. Erst die Deletion von 200 C-terminalen Aminosäuren führte zu einer zytoplasmatischen Lokalisation. Der Bereich der Aminosäuren NimA<sub>500-600</sub> ist demnach für die Septumlokalisierung essentiell. Der Stamm AfS35 *nimA<sub>1-500</sub>-gfp* bot noch eine weitere interessante Beobachtung. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen

Untersuchung konnte neben der Lokalisation des Fusionsproteins NimA<sub>1-500</sub>-GFP an den Septen in einzelnen apikalen Hyphenabschnitten auch eine Fluoreszenzmarkierung rundlicher Strukturen dokumentiert werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Lokalisation des Fusionsproteins in der Peripherie der Zellkerne. Dies würde bedeuten, dass das verkürzte Teilprotein NimA<sub>1-500</sub> nach wie vor in der Lage wäre, die für NimA physiologische Translokation vom Septum zum Zellkern auszuführen. Es wäre hierbei interessant, herauszufinden, ob dieses Teilprotein neben der Translokation zu den Zellkernen auch in der Lage wäre, dort eine Mitose zu initiieren. Um dies zu testen, müsste die chromosomale Kopie des *nimA*-Gens aus dem Genom des Stammes deletiert werden, damit kein natives NimA mehr exprimiert wird. Dies könnte sich allerdings als kompliziert herausstellen, sollte NimA<sub>1-500</sub> doch nicht in der Lage sein, Mitosen einzuleiten. Durch das Fehlen eines funktionellen NimA-Proteins wäre in diesem Stamm dann keine Zellkernteilung und damit kein Wachstum möglich.

Ein im Zuge der Untersuchung der Septumslokalisation von NimA völlig unerwartetes Ergebnis lieferte zudem das Teilprotein NimA<sub>296-601</sub>. Dieses sowohl N-terminal als auch C-terminal verkürzte Protein ist in *A. fumigatus* interessanterweise an den Mitochondrien lokalisiert. Diese Lokalisation wurde anhand des die Mitochondrien färbenden Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker Deep Red FM bestätigt und war im Bezug auf NimA bislang nicht bekannt. Um zu verstehen, warum genau dieser Bereich des Proteins eine Bindung an die Mitochondrien vermittelt, wurde die Aminosäuresequenz von NimA<sub>296-601</sub> auf mögliche, in diesem Abschnitt vorliegenden Domänen analysiert. Die *coiled coil*-Domäne des Proteins (NimA<sub>296-378</sub>) bot dabei einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Ein auf die *coiled coil*-Domäne verkürztes Teilprotein in Fusion mit GFP führte allerdings nicht zu einer Lokalisation an den Mitochondrien. Nur wenn die *coiled coil*-Domäne mit einem Teil des C-Terminus vorliegt, war die mitochondriale Lokalisation reproduzierbar, so zu beobachten bei dem Teilprotein NimA<sub>296-601</sub>. Es war nicht klar ersichtlich, weshalb NimA<sub>296-601</sub> an den Mitochondrien lokalisiert ist. Vermutlich handelt es sich bei der beobachteten Lokalisation des Teilproteins um ein zufällig hervorgerufenes Artefakt. Die Sequenz von NimA<sub>296-601</sub> scheint eine Protein-Protein-Interaktion mit einem Bestandteil der äußeren mitochondrialen Membran einzugehen, welche bislang noch nicht beobachtet wurde. Da es im Zusammenhang mit der physiologischen

Aktivität von NimA in einer Hyphe bislang keine Hinweise auf eine Interaktion mit den Mitochondrien gibt, ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete Lokalisation des verkürzten NimA-Proteins durch den N- und/oder C-Terminus des Proteins verhindert wird. Es ist als eher unwahrscheinlich anzusehen, dass die Mitochondrien im Zusammenhang mit der Funktion von NimA bei der Mitoseeinleitung und Septumsporenöffnung stehen. Die Bindung des verkürzten NimA-Proteins an die äußere Mitochondrienmembran stellt allerdings dennoch eine interessante Erkenntnis dar. Sie könnte beispielsweise zur Entwicklung eines *in vivo* Protein-Protein-Interaktions-Assays in *Aspergillus* spp. dienen, wobei die Sequenz von NimA<sub>296-601</sub> zur distinkten Lokalisation eines putativen Partners an den Mitochondrien genutzt werden könnte. Ein vergleichbares Assay stellt beispielsweise das sogenannte *Yeast Two-Hybrid*-System dar, welches hauptsächlich in der Hefe *S. cerevisiae* Anwendung findet. In diesem Assay liegt ein für die Expression eines sogenannten Reportergens nötiger Transkriptionsfaktor in seine DNS-Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne aufgeteilt vor. Je eine Domäne des Transkriptionsfaktors wird im Zuge des Tests mit einem zu untersuchenden Protein gekoppelt. Interagieren die zwei Proteine im Sinne einer Protein-Protein-Interaktion miteinander, so werden die zwei Domänen des Transkriptionsfaktors vereint. Der vollständige Transkriptionsfaktor aktiviert daraufhin die Expression des ihm nachgeschalteten Reportergens, wobei bei der Hefe beispielsweise eine Fluoreszenz hervorgerufen oder ein Wachstum auf Selektivmedium ermöglicht wird. Einen Nachteil dieses Assays stellt die Tatsache dar, dass der verwendete Transkriptionsfaktor im Zellkern vorliegt und demnach die auf die Protein-Protein-Interaktion zu testenden Proteine ebenfalls in den Zellkern gelangen müssen. Mit NimA<sub>296-601</sub> könnte dagegen ein Assay für Protein-Protein-Interaktionen im zytoplasmatischen Raum entwickelt werden. Hierbei könnte NimA<sub>296-601</sub> mit der Sequenz eines der zu untersuchenden Proteine fusioniert werden. Durch die Bindung von NimA<sub>296-601</sub> an der äußeren Membran der Mitochondrien wäre auch das zu untersuchende Protein dort lokalisiert. Dass NimA<sub>296-601</sub> als Fusionsprotein in der Lage ist, die distinkte Lokalisation an den Mitochondrien hervorzurufen, wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Fusion mit GFP bewiesen. Es spricht daher anhand der erarbeiteten Untersuchungsergebnisse nichts dagegen, dass diese Lokalisation auch in Fusion mit einem anderen Protein stattfinden würde. Das zweite im Assay auf die Protein-Protein-Interaktion zu untersuchende Protein sollte mit einem

fluoreszierenden Protein wie GFP fusioniert werden. Findet eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden zu untersuchenden Proteinen statt, so wäre eine grüne Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien zu beobachten. Findet keine Interaktion statt, so wäre das GFP-Signal zytoplasmatisch. Die Lokalisation von NimA<sub>296-601</sub> an den Mitochondrien wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit lediglich in der Spezies *A. fumigatus* dokumentiert. Es gibt allerdings keinen Hinweis darauf, dass die Lokalisation nicht auch in der häufig als Testorganismus verwendeten Spezies *A. nidulans* reproduzierbar ist.

Gegen Ende der Studien an NimA sollte die Aktivität des Proteins als Initiator der Mitose im Zusammenhang mit seiner Lokalisation genauer untersucht werden. Es war bislang bekannt, dass NimA für die Öffnung der Septumsporen sowie die Einleitung der Mitose in apikalen Zellkompartimenten verantwortlich ist. Eine Translokation des Proteins von der Septumspore aus in die Zellkernperipherie führt zum Verschluss der Septumspore und beendet durch die Initiierung der Zellkernteilung die Interphase in dem betroffenen Zellkompartiment. Es war zudem bekannt, dass eine Inaktivierung der Kinase-Domäne von NimA in *A. nidulans* in der Interphase zu geschlossenen Septumsporen führt (SHEN *et al.*, 2014). Es war allerdings nicht klar, inwieweit die Kinasefunktion des Proteins für diese Vorgänge verantwortlich war. Um nun in Erfahrung zu bringen, ob die Aktivität der Kinase-Domäne für die Lokalisation und Translokation des Proteins wichtig ist, sollte die Kinase-Domäne durch Mutationen inaktiviert werden. Hierfür wurde zunächst in der Literatur nach Hinweisen auf potentielle Zielstrukturen für eine Beeinflussung der Kinase-Aktivität von NimA gesucht. Es beschäftigten sich bereits einige Studien mit NimA, wobei diese jedoch mit *A. nidulans* durchgeführt wurden. Um die dort beschriebenen Erkenntnisse auf NimA aus *A. fumigatus* übertragen zu können, wurde vorerst über einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden homologen Proteine sichergestellt, dass dort keine großen Unterschiede vorliegen. Ein Aminosäuresequenz-Alignement erwies, dass die Sequenz von NimA aus *A. fumigatus* der Sequenz aus *A. nidulans* entspricht (siehe Abbildung Anhang A 17). Daraufhin wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene, Studien auf NimA in *A. fumigatus* übertragen und durchgeführt.

Eine von Knighton *et al.* (1991) durchgeführte Strukturanalyse ergab, dass NimA im Bereich der Aminosäuren NimA<sub>165-171</sub> einen sogenannten *catalytic loop*

aufweist. Das an diesem aktiven Zentrum beteiligte Aminosäuremuster ist zudem innerhalb der Gruppe der Proteinkinasen gut konserviert. Speziell der Asparaginsäure (D) an Position NimA<sub>166</sub> wurde eine Schlüsselrolle bei der Katalysereaktion zugeschrieben (KNIGHTON *et al.*, 1991). In einer späteren Studie konnte ebenfalls die Aminosäure NimA<sub>166</sub> als essentiell für die Kinaseaktivität herausgearbeitet werden (VALIEV *et al.*, 2003). Somit wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit für eine Beeinflussung der Kinaseaktivität von NimA der Fokus zunächst auf NimA<sub>166</sub> gelegt. Es wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem an NimA<sub>166</sub> das für Asparaginsäure (D) codierende Basentriplett GAC in das für die Aminosäure Alanin (A) codierende Basentriplett GCC umgewandelt wurde. Alanin wurde dabei mit Bedacht gewählt, da die Mutation D166A neben dem Austausch der Aminosäuren zudem eine Ladungsverschiebung (sauer geladene Asparaginsäure zu ungeladenem Alanin) innerhalb des katalytischen Zentrums hervorruft. Durch diesen Eingriff in die Aminosäuresequenz konnte erwartet werden, dass die Kinase-Funktion von NimA beeinträchtigt wird. Das NimA<sup>(D166A)</sup>-GFP-Fusionsprotein ist in AfS35 am Septum lokalisiert. Die Mutation und die damit vermutlich einhergehende Inaktivierung der Kinase-Domäne führten demnach nicht zu einem Verlust der physiologischen Lokalisation des Proteins. Shen *et al.* (2014) haben für *A. nidulans* gezeigt, dass die Kinaseaktivität von NimA wichtig ist, um die Septenpore in der Interphase offen zu halten. Zusammengefasst scheint die Kinaseaktivität also nicht für die Lokalisation am Septum, wohl aber für das Offenhalten der Pore wichtig zu sein.

Eine weitere, bereits in der Literatur beschriebene Aminosäuresubstitution stellt die Mutation K40M der Aminosäure NimA<sub>40</sub> dar. Die Mutation, bei der Lysin (K) an Position NimA<sub>40</sub> durch ein Methionin (M) ersetzt wird, führt in *A. nidulans* zu einer Inaktivierung der Kinase-Domäne (LU & MEANS, 1994). Diese Mutation wurde für NimA aus *A. fumigatus* nachgeahmt, indem das Basentriplett AAA von NimA<sub>40</sub>, codierend für die Aminosäure Lysin (K), durch das für die Aminosäure Methionin (M) codierende Basentriplett ATG ersetzt und das mutierte Protein NimA<sup>(K40M)</sup> als GFP-Fusionsprotein in AfS35 exprimiert wurde. Auch dieses mutierte NimA<sup>(K40M)</sup>-Molekül war nach wie vor an den Septen der Hyphen lokalisiert, was die im letzten Absatz beschriebenen Ergebnisse bestätigt.

Eine dritte durchgeführte Manipulation von NimA stellt die in der Literatur als *nimA5* bezeichnete Mutation dar. Sie betrifft die Aminosäure NimA<sub>91</sub> und resultiert



in *A. nidulans* in einem Temperatur-sensitiven NimA-Molekül. Bei dem Überschreiten einer kritischen Temperatur (37 °C) führt *nimA5* zu einer Umfaltung des NimA-Proteins und damit zu einem Arrest der Zellen im Stadium G2 des Zellzyklus (LU & MEANS, 1994; GOVINDARAGHAVAN *et al.*, 2014). Die *nimA5* Mutation stellt die Substitution der nativen Aminosäure Tyrosin (Y) in die Aminosäure Asparagin (N) dar. Da die Proteinsequenz von NimA aus *A. fumigatus* der aus *A. nidulans* entspricht, drückt sich die *nimA5* Mutation in *A. fumigatus* auch durch eine Substitution der Aminosäure NimA<sub>91</sub> von Tyrosin (Y) in Asparagin (N) aus, wobei hierfür das native Basentriplett TAC in AAC umgewandelt wurde. Das mutierte NimA<sup>(Y91N)</sup>-Protein wurde als Fusionsprotein mit GFP in AfS35 exprimiert. Der entstandene Stamm AfS35 *nimA*<sup>(Y91N)</sup>-*gfp* wurde im Anschluss bei 30 °C über Nacht angezogen und am nächsten Tag bei Raumtemperatur fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Fusionsprotein NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP war wie bereits bei NimA<sup>(D166A)</sup>-GFP und NimA<sup>(K40M)</sup>-GFP beobachtet an den Septen lokalisiert. Eine dreistündige Inkubation des Stammes AfS35 *nimA*<sup>(Y91N)</sup>-*gfp* bei 37 °C führte allerdings zu interessanten Beobachtungen. Es konnten im Zuge einer mikroskopischen Untersuchung Fluoreszenzmarkierungen dokumentiert werden, die bei einem NimA-GFP-Fusionsprotein physiologischerweise nicht vorkommen. Dies waren punktförmige distinkte Anreicherung im Zytoplasma, die keiner Struktur eindeutig zugeordnet werden konnten. Hierbei könnte es sich um Fehllokalisationen des mutierten NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP-Fusionsproteins handeln, welches nach der erfolgten Inkubation bei 37 °C und der darauffolgenden Umfaltung des Proteins seine physiologische Lokalisation verloren hatte. Dieser Lokalisationsverlust war jedoch nicht in jeder Hypho zu beobachten. Es gab auch einige Hyphen, in denen das NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP-Fusionsprotein an den Septen lokalisiert war. Eine weitere interessante Beobachtung stellten Fluoreszenzmarkierungen dar, die aufgrund ihrer Form und Lokalisation höchstwahrscheinlich den Zellkernen zugeordnet werden können. Eine Färbung der Zellkerne ist, wie bereits genannt, in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, weshalb die Zellkernmarkierung nur eine Vermutung darstellt. Die Lokalisation könnte durch eine Ko-Expression des im Zuge der vorliegenden Arbeit bei Experimenten mit GFP-TcsC verwendeten Fusionsproteins RFP-StuAc-Terminus als Zellkernmarker identifiziert werden. Da die Lokalisation von NimA in der Zellkernperipherie nur während einer Mitose und demnach nur für eine kurze Zeitspanne vorliegt, stellt die Beobachtung der Zellkernmarkierung durch ein

NimA-GFP-Fusionsprotein per se eine gewisse Herausforderung dar. Die beobachtete Lokalisation des NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP-Fusionsproteins würde jedoch bedeuten, dass das Fusionsprotein auch bei erhöhter Temperatur in der Lage ist, in die Zellkernperipherie zu translozieren. Aufgrund der paarweisen Anordnung der fluoreszenzmarkierten Strukturen kann zudem von einer kürzlich durchlaufenen Zellkernteilung in den jeweiligen Hyphenabschnitten ausgegangen werden. Ob die Mitose durch das NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP-Fusionsprotein initiiert wurde, konnte in dem untersuchten Stamm nicht geklärt werden. Möglicherweise ist die Aktivität der Kinase-Domäne nicht für die Translokation nötig, sondern wird erst in der Zellkernperipherie bei der Einleitung der Mitose essentiell. Das könnte bedeuten, dass das NimA<sup>(Y91N)</sup>-Protein nach seiner temperaturbedingten Umfaltung zwar die Translokation in die Peripherie der Zellkerne vollziehen kann, jedoch dort nicht in der Lage ist, seine physiologische Aktivität bei der Mitoseeinleitung wahrzunehmen.

Es konnte zudem festgestellt werden, dass keine der Punktmutationen die Lokalisation des NimA-Moleküls am Septum verhinderte. Im Hinblick darauf, dass bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass auch die vollständige Deletion der Kinase-Domäne, wie bei NimA<sub>296-700</sub> erfolgt, keine Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins am Septum hat, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Interessant war dagegen, dass die mutierten NimA-Proteine nicht zu einem dominant letalen Phänotyp im exprimierenden Stamm führten. Das native NimA-Molekül wurde demnach durch die Expression der Fusionsproteine NimA<sup>(Y91N)</sup>-GFP, NimA<sup>(D166A)</sup>-GFP oder NimA<sup>(K40M)</sup>-GFP nicht in seiner Aktivität unterdrückt. Dieses Ergebnis ist dahingehend wichtig, als dass in *A. nidulans* eine Überexpression von NimA-Proteinen durch einen pleiotrophen Effekt zum Zelltod führt (OSMANI *et al.*, 1988). Dieser dominant negative Effekt ist auch bei einer Überexpression von NimA-Proteinen zu beobachten, die ohne ihre Kinase-Domäne exprimiert werden (LU & MEANS, 1994). Hier zeigen sich also deutliche Unterschiede zwischen den mit *A. fumigatus* erzielten Ergebnissen dieser Arbeit und den für *A. nidulans* publizierten Daten.

Um die Funktionalität der hergestellten NimA-Konstrukte und damit speziell die Auswirkungen einer Inhibition der Kinase-Domäne weiter untersuchen zu können, müsste in einem nächsten Schritt die chromosomale Kopie des *nimA*-Gens aus dem Genom des jeweiligen Stammes deletiert werden, damit kein natives NimA mehr

exprimiert wird. Nur so könnte die Funktionalität des punktmutierten NimA<sup>(Y91N)</sup> getestet werden. Vielleicht betrifft die temperaturbedingte Fehlfaltung des punktmutierten Proteins sowohl die Kinase-Aktivität von NimA als auch dessen Lokalisation. Es könnte allerdings auch sein, dass lediglich eine dieser Aktivitäten beeinflusst wird. Zudem wäre es möglich, dass die *nimA5* Mutation in *A. fumigatus* erst bei höheren Temperaturen zu einer Fehlfaltung des NimA-Proteins führt. In *A. nidulans* findet dies bei 37 °C statt, eventuell wäre bei *A. fumigatus* ein Experiment mit höheren Temperaturen sinnvoll. Die Deletion des *nimA*-Gens konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden und stellt somit einen Ausgangspunkt für Folgeuntersuchungen dar.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der pathogenen Schimmelpilz-Spezies *Aspergillus fumigatus*, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin einen relevanten Krankheitserreger darstellt. *A. fumigatus* kann verschiedene Erkrankungen auslösen kann, die in Ausprägung und Schweregrad zu großen Teilen von dem immunologischen Status des betroffenen Wirtes abhängen. Die primäre Infektion findet meist in der Lunge statt, es kann sich jedoch eine von der Lunge ausgehende, generalisierte Infektion entwickeln. *A. fumigatus* ist allerdings nicht nur in der Medizin relevant, sondern stellt auch in der Landwirtschaft als Ernekontaminant und Nutztierpathogen ein wirtschaftliches Problem dar. Es gibt derzeit nur eine begrenzte Auswahl an Antimykotika, was im Hinblick auf die potentiell hohe Mortalitätsrate bei einer *Aspergillus*-Infektion sowie auf die mittlerweile nicht unbedenkliche Resistenzlage der Erreger durchaus besorgniserregend ist. Als Ausgangspunkt auf der Suche nach neuartigen antifungalen Mitteln kommt unter anderem der sogenannte *High Osmolarity Glycerol* (HOG)-Signalweg in Frage, eine für Pilze spezifische Enzymkaskade, die den Organismus auf externe Stressoren wie hyperosmolare Bedingungen adaptiert. Die pharmakologische Aktivierung des HOG-Signalwegs führt zu einer Entgleisung des Wasserhaushaltes der Hyphen mit potentiell fungizider Wirkung. Ein von Dr. Anja Spadinger in *A. fumigatus* etabliertes Screeningsystem für antifungale Wirkstoffe beruht auf der fungiziden Wirkung der HOG-Signalwegsaktivierung. Es wurde in dieser Arbeit auch für *A. nidulans* etabliert und wird zurzeit von einem industriellen Partner eingesetzt.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Gruppe III-Hybrid-Histidin-Kinase TcsC, dem Sensorprotein des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus*. TcsC wurde hinsichtlich seiner Funktionalität näher untersucht, wobei der Fokus auf der Analyse der Aktivität in Zusammenhang mit der Lokalisation des Proteins in einer Hyphe lag. Die Lokalisation wurde mithilfe von GFP- und RFP-Fusionsproteinen fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die das Verhalten von TcsC unter dem Einfluss von HOG-Signalweg aktivierenden Stressoren wie hyperosmolarem Medium oder dem Phenylpyrrol Fludioxonil dokumentierten. Es konnte beobachtet werden, dass TcsC im inaktiven Zustand im Zellkern lokalisiert ist, bei Aktivierung in das Zytoplasma transloziert und nach einer gewissen Zeit

eine Translokation zurück in den Zellkern stattfindet. Desweiteren erfolgte eine Eingrenzung der für die Zellkernlokalisation verantwortlichen Proteinsequenz, die sogenannte *nuclear localization sequence* (NLS). Dieses Muster befindet sich in TcsC, und auch in dem zu TcsC homologen Protein NikA aus *A. nidulans*, in der N-terminalen Aminosäuresequenz TcsC<sub>1-162</sub> bzw. NikA<sub>1-124</sub>. Die Durchführung diverser Manipulationen der NLS zeigte, dass speziell eine auffällige Ansammlung basischer Aminosäuren im Bereich von TcsC<sub>127-137</sub> bzw. NikA<sub>92-96</sub> für die Lokalisation im Zellkern essentiell ist. Die Substitution einer einzelnen Aminosäure an Position TcsC<sub>129</sub> bzw. NikA<sub>94</sub> des basischen Aminosäure-Clusters führte zu einem Verlust der Zellkernlokalisation. Es konnte im Zuge dieser Experimente festgestellt werden, dass ein überexprimiertes GFP-TcsC-Fusionsprotein einen negativen Einfluss auf die Anpassungsfähigkeit des Organismus an hyperosmolaren Stress ausübt.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Ser-/Thr-spezifischen Proteinkinase NimA. Dieses Protein reguliert anhand seiner Lokalisation die mitotischen Prozesse in einer Hyphe. In der Interphase einer Zelle befindet sich NimA im Bereich der Septumsporen, seine Translokation in die Zellkernperipherie und die darauffolgende Bindung an die Spindelkörper leitet die Mitose ein. Anhand der durchgeführten Experimente konnte die für die Lokalisation am Septum verantwortliche Proteinsequenz eingegrenzt werden, wobei speziell der Bereich von NimA<sub>500-600</sub> eine wichtige Rolle spielt. Ein unerwartetes Ergebnis lieferte die Proteinsequenz von NimA<sub>296-601</sub>, die den Bereich der *coiled coil*-Domäne und einen Teil des C-Terminus abbildet. Die Expression des NimA<sub>296-601</sub>-Teilproteins als GFP-Fusionsprotein in *A. fumigatus* führte zu einer Lokalisation des Fusionsproteins an den Mitochondrien. Diese interessante Erkenntnis könnte einen Ausgangspunkt für die Entwicklung eines *in vivo* Protein-Protein-Interaktions-Assays darstellen. Es wurden zudem Punktmutationen in der Kinase-Domäne von NimA gesetzt, die zeigten, dass die Lokalisation des Proteins am Septum unabhängig von der Kinaseaktivität ist. In Folgeprojekten können die mutierten Proteine einer Studie der Aktivität von NimA dienen.

## VII. SUMMARY

This study examined the pathogenic mould species *Aspergillus fumigatus*, which is a relevant pathogen in both human and veterinary medicine. *A. fumigatus* can trigger various diseases, the severity of which largely depends on the immunological status of the affected host. The primary infection usually occurs in the lung, but a generalized infection can be developed. However, *A. fumigatus* is not only relevant in medicine, but poses also an economic problem in agriculture as a pathogen for farm animals and as crop contamination. At present, there is only a limited number of antimycotic agents available, which is quite alarming in view of the potentially high mortality rate caused by an *Aspergillus*-infection and the incidence of resistance to some of the substances. The so-called *High Osmolarity Glycerol* (HOG) pathway, a fungal specific signaling cascade that adapts the organism to external stressors such as hyperosmotic conditions, can be considered as a potential target structure in the search for novel antifungal agents. The pharmacological activation of the HOG pathway leads to a derailment of the hyphal water balance with potentially fungicidal effects. A screening assay for antifungal agents developed by Dr. Anja Spadinger is based on the fungicidal effect caused by the activation of HOG signaling and was initially established in *A. fumigatus*. In this study it was also established for *A. nidulans* and is currently used by an industrial partner.

In addition, the functionality of the group III hybrid histidine kinase TcsC, the sensor protein of the HOG pathway in *A. fumigatus*, was investigated in detail with the focus set on the analysis of the activity and localization of the protein in a hypha. The localization of the proteins in a hypha was visualized by fluorescence microscopy using GFP and RFP fusion proteins. Investigations were performed to document the behavior of TcsC under the influence of HOG pathway-activating stressors such as hyperosmotic medium or the phenylpyrrole fludioxonil. It was shown that TcsC in its inactive state is located in the cell nucleus, translocates into the cytoplasm upon activation and after a certain time translocates back into the cell nucleus. Furthermore, the protein sequence responsible for the localization in the cell nucleus, the so-called *nuclear localization sequence* (NLS), was characterized for TcsC and its homologous *A. nidulans* protein NikA. It resides in the N-terminal amino acid sequences TcsC<sub>1-162</sub> and NikA<sub>1-124</sub>, respectively. Partial deletions and

point mutations in these NLSs showed that especially a conspicuous accumulation of basic amino acids corresponding to TcsC<sub>127-137</sub> and NikA<sub>92-96</sub>, respectively, is essential for the localization in the cell nucleus. The substitution of a single amino acid at position TcsC<sub>129</sub> or NikA<sub>94</sub> in the basic amino acid cluster led to a loss of cell nucleus localization. In the course of these experiments it was found that an overexpressed GFP-TcsC fusion protein has a negative influence on the adaptability of the organism to hyperosmolar stress.

Another part of this study dealt with the Ser-/Thr-specific protein kinase NimA. This protein regulates mitotic processes in a hypha through shuttles between the nucleus and the septal pore. During interphase, NimA is located in the region of the septal pores, its translocation to the nuclear periphery and the subsequent binding to the spindle bodies initiates mitosis. Experiments carried out in this work enabled us to narrow down the protein sequence responsible for localisation at the septal pore. The NimA<sub>500-600</sub> region was identified as particularly important. An unexpected result was obtained with the NimA<sub>296-601</sub> sequence, which comprises a *coiled coil* domain and part of the C-terminus. The expression of a NimA<sub>296-601</sub>-GFP-fusionprotein in *A. fumigatus* led to a localization at the mitochondria. This interesting finding could serve as a starting point for the development of an *in vivo* protein interaction assay. In addition, point mutations in the kinase domain of NimA have been established, which showed that the localization of the protein at the septal pore is independent of the activity of the kinase domain. They also provide a base for follow up projects, in which the mutations can be used to study the activity of NimA.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latge JP. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009; 460: 1117-21.
- Al Abdallah Q, Choe SI, Campoli P, Baptista S, Gravelat FN, Lee MJ, Sheppard DC. A conserved C-terminal domain of the *Aspergillus fumigatus* developmental regulator MedA is required for nuclear localization, adhesion and virulence. *PLoS ONE* 2012; 7: e49959.
- Alex LA, Borkovich KA, Simon MI. Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3416-21.
- Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, Cole PJ, Wilson R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun* 1995; 63: 3266-71.
- Aravind L, Ponting CP. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 176: 111-6.
- Arne P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Femenia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *Int J Microbiol* 2011; 2011: 746356.
- Azevedo MM, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 7463-8.
- Bachmann SP, Patterson TF, Lopez-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2228-30.
- Bahn YS, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 57-69.
- Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 2017-36.
- Beauvais A, Latge JP. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 38-49.



- Bennett JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med* 2006; 355: 1154-9.
- Bowman JC, Abruzzo GK, Flattery AM, Gill CJ, Hickey EJ, Hsu MJ, Kahn JN, Liberator PA, Misura AS, Pelak BA, Wang TC, Douglas CM. Efficacy of caspofungin against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, and *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4202-5.
- Brandhorst TT, Kean IRL, Lawry SM, Wiesner DL, Klein BS. Phenylpyrrole fungicides act on triosephosphate isomerase to induce methylglyoxal stress and alter hybrid histidine kinase activity. *Sci Rep* 2019; 9: 5047.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 1993; 259: 1760-3.
- Bruder Nascimento AC, Dos Reis TF, de Castro PA, Hori JI, Bom VL, de Assis LJ, Ramalho LN, Rocha MC, Malavazi I, Brown NA, Valiante V, Brakhage AA, Hagiwara D, Goldman GH. Mitogen activated protein kinases SakA(HOG1) and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* 2016; 100: 841-59.
- Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet Biol* 2005; 42: 98-106.
- Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 2003; 2: 1151-61.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69: 2110-4.
- Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 447-65.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, Reus
- Defosse TA, Sharma A, Mondal AK, Duge de Bernonville T, Latge JP, Calderone R, Giglioli-Guivarc'h N, Courdavault V, Clastre M, Papon N. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol Microbiol* 2015; 95: 914-24.
- Du C, Sarfati J, Latge JP, Calderone R. The role of the sakA (Hog1) and tcsB (sln1) genes in the oxidant adaptation of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2006; 44: 211-8.

- Fassler JS, West AH. Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryot Cell* 2011; 10: 156-67.
- Feldherr CM, Kallenbach E, Schultz N. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 1984; 99: 2216-22.
- Finan JD, Guilak F. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *J Cell Biochem* 2010; 109: 460-7.
- Govindaraghavan M, Lad AA, Osmani SA. The NIMA kinase is required to execute stage-specific mitotic functions after initiation of mitosis. *Eukaryot Cell* 2014; 13: 99-109.
- Grice CM, Bertuzzi M, Bignell EM. Receptor-mediated signaling in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol* 2013; 4: 26.
- Gsaller F, Furukawa T, Carr PD, Rash B, Jochl C, Bertuzzi M, Bignell EM, Bromley MJ. Mechanistic Basis of pH-Dependent 5-Flucytosine Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62
- Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Toyotome T, Yoshimi A, Abe K, Kamei K, Gonoi T, Kawamoto S. Nika/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 2013; 8: e80881.
- Hakkouni AE, Mansouri N. [Invasive pulmonary aspergillosis in a patient with human immunodeficiency virus (HIV)]. *Pan Afr Med J* 2018; 31: 40.
- Hammond SP, Marty FM, Bryar JM, DeAngelo DJ, Baden LR. Invasive fungal disease in patients treated for newly diagnosed acute leukemia. *Am J Hematol* 2010; 85: 695-9.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-80.
- Hartmann T, Dumig M, Jaber BM, Szewczyk E, Olbermann P, Morschhauser J, Krappmann S. Validation of a self-excising marker in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* by employing the beta-rec/six site-specific recombination system. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 6313-7.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 2007; 153: 1677-92.
- Herivaux A, So YS, Gastebois A, Latge JP, Bouchara JP, Bahn YS, Papon N. Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005683.

- Hill TW, Kafer E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports* 2001; 48: 20-1.
- Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 300-72.
- Hunter CC, Siebert KS, Downes DJ, Wong KH, Kreutzberger SD, Fraser JA, Clarke DF, Hynes MJ, Davis MA, Todd RB. Multiple nuclear localization signals mediate nuclear localization of the GATA transcription factor AreA. *Eukaryot Cell* 2014; 13: 527-38.
- Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1092-7.
- Jans DA, Xiao CY, Lam MH. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 2000; 22: 532-44.
- Kaefer E. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 1965; 52: 217-32.
- Kaur H, Singh S, Rathore YS, Sharma A, Furukawa K, Hohmann S, Ashish, Mondal AK. Differential role of HAMP-like linkers in regulating the functionality of the group III histidine kinase DhNik1p. *J Biol Chem* 2014; 289: 20245-58.
- Kilani J, Fillinger S. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Front Microbiol* 2016; 7: 2014.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 1991; 253: 407-14.
- Kojima K, Takano Y, Yoshimi A, Tanaka C, Kikuchi T, Okuno T. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol Microbiol* 2004; 53: 1785-96.
- Krappmann S, Sasse C, Braus GH. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 212-5.
- Lamarre C, Ibrahim-Granet O, Du C, Calderone R, Latge JP. Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 2007; 44: 682-90.

- Lan H, Wu L, Fan K, Sun R, Yang G, Zhang F, Yang K, Lin X, Chen Y, Tian J, Wang S. Set3 Is Required for Asexual Development, Aflatoxin Biosynthesis, and Fungal Virulence in *Aspergillus flavus*. *Front Microbiol* 2019; 10: 530.
- Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-50.
- Lavin JL, Ramirez L, Ussery DW, Pisabarro AG, Oguiza JA. Genomic analysis of two-component signal transduction proteins in basidiomycetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2010; 18: 63-73.
- Ledoux MP, Denis J, Nivoix Y, Herbrecht R. Isavuconazole: A new broad-spectrum azole. Part 2: pharmacokinetics and clinical activity. *J Mycol Med* 2018; 28: 15-22.
- Lew RR, Levina NN. Turgor regulation in the osmosensitive cut mutant of *Neurospora crassa*. *Microbiology* 2007; 153: 1530-7.
- Lew RR, Nasserifar S. Transient responses during hyperosmotic shock in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Microbiology* 2009; 155: 903-11.
- Li S, Ault A, Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ, Fassler JS. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *Embo j* 1998; 17: 6952-62.
- Lu KP, Means AR. Expression of the noncatalytic domain of the NIMA kinase causes a G2 arrest in *Aspergillus nidulans*. *Embo j* 1994; 13: 2103-13.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 1994; 369: 242-5.
- Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 Suppl 1: 1-10.
- McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol* 2010; 12: 1535-43.
- McCormick A, Jacobsen ID, Broniszewska M, Beck J, Heesemann J, Ebel F. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 2012; 7
- Meena N, Kaur H, Mondal AK. Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J Biol Chem* 2010; 285: 12121-32.

- Meler E, Dunn M, Lecuyer M. A retrospective study of canine persistent nasal disease: 80 cases (1998–2003). *The Canadian Veterinary Journal* 2008; 49: 71.
- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1897-904.
- Miller KY, Wu J, Miller BL. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* 1992; 6: 1770-82.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-73.
- Nanduri J, Tartakoff AM. Perturbation of the nucleus: a novel Hog1p-independent, Pkc1p-dependent consequence of hypertonic shock in yeast. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 1835-41.
- Nascimento PAM, Picheli FP, Lopes AM, Pereira JFB, de Carvalho Santos-Ebinuma V. Effects of cholinium-based ionic liquids on *Aspergillus niger* lipase: stabilizers or inhibitors. *Biotechnol Prog* 2019;
- Neofytos D, Lu K, Hatfield-Seung A, Blackford A, Marr KA, Treadway S, Ostrander D, Nussenblatt V, Karp J. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75: 144-9.
- O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457: 471-4.
- Osmani AH, Davies J, Liu HL, Nile A, Osmani SA. Systematic deletion and mitotic localization of the nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 4946-61.
- Osmani SA, Pu RT, Morris NR. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* 1988; 53: 237-44.
- Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Nguyen MH, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, Walsh TJ, Wingard JR, Young JA, Bennett JE. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 63: e1-e60.

- Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16: 603-16.
- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Doern GV, Diekema DJ. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2163-7.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 1996; 86: 865-75.
- Posas F, Saito H. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *Embo j* 1998; 17: 1385-94.
- Pott GB, Miller TK, Bartlett JA, Palas JS, Selitrennikoff CP. The isolation of FOS-1, a gene encoding a putative two-component histidine kinase from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 2000; 31: 55-67.
- Puntenney SB, Wang Y, Forsberg NE. Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics and prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome. Southwest Nutrition & Management Conference; Pheonix, Tuscon: University of Arizona, Department of Animal Science 2003; 49-63.
- Ruhnke M, Groll AH, Mayser P, Ullmann AJ, Mendling W, Hof H, Denning DW. Estimated burden of fungal infections in Germany. *Mycoses* 2015; 58 Suppl 5: 22-8.
- Rybak JM, Ge W, Wiederhold NP, Parker JE, Kelly SL, Rogers PD, Fortwendel JR. Mutations in *hmg1*, Challenging the Paradigm of Clinical Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *MBio* 2019; 10
- Santos JL, Shiozaki K. Fungal histidine kinases. *Sci STKE* 2001; 2001
- Schmidt A. Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 1998; 41: 89-91.
- Schultz RM, Johnson EG, Wisner ER, Brown NA, Byrne BA, Sykes JE. Clinicopathologic and diagnostic imaging characteristics of systemic aspergillosis in 30 dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 851-9.
- Seebacher C, Lotti T, Rocchia MG, Fioranelli M, Wollina U. Outstanding personalities in German-speaking mycology : Dedicated to Professor Dr. Johannes Muller. *Wien Med Wochenschr* 2017; 167: 8-19.

- Seyedmousavi S, Guillot J, Arne P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Med Mycol* 2015; 53: 765-97.
- Seyedmousavi S, Wiederhold NP, Ebel F, Hedayati MT, Rafati H, Verweij PE. Antifungal Use in Veterinary Practice and Emergence of Resistance. In: *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*, 1 edn. Seyedmousavi S, Sybren de Hoog G, J. G, Verweij PE, eds.: Springer International Publishing 2018: 359-402.
- Shen KF, Osmani AH, Govindaraghavan M, Osmani SA. Mitotic regulation of fungal cell-to-cell connectivity through septal pores involves the NIMA kinase. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 763-75.
- Shor E, Chauhan N. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog* 2015; 11
- Spadinger A, Ebel F. Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* TcsC, a characteristic type III hybrid histidine kinase of filamentous fungi harboring six HAMP domains. *Int J Med Microbiol* 2017; 307: 200-8.
- Spadinger AR (2018) Die Aktivierung der Signalkinase TcsC und des High Osmolarity Glycerol (HOG) Signalwegs in *Aspergillus fumigatus* als neue Strategie zur Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen, München. 91
- Spellig T, Bottin A, Kahmann R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* 1996; 252: 503-9.
- Suelmann R, Sievers N, Fischer R. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 1997; 25: 757-69.
- Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latge JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5
- Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2343-5.
- Tao W, Malone CL, Ault AD, Deschenes RJ, Fassler JS. A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, SLN1. *Mol Microbiol* 2002; 43: 459-73.
- Thompson GR, 3rd, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29: 103-10.

- Valiev M, Kawai R, Adams JA, Weare JH. The role of the putative catalytic base in the phosphoryl transfer reaction in a protein kinase: first-principles calculations. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 9926-7.
- Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Janssen WH, Meis JF, Mouton JW. In vitro activities at pH 5.0 and pH 7.0 and in vivo efficacy of flucytosine against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4483-5.
- Verweij PE, Lestrade PP, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*: beneficial or biased? *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 2079-82.
- Wiedemann A, Spadinger A, Löwe A, Seeger A, Ebel F. Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds. *International Journal of Medical Microbiology* 2016; 306: 642-51.
- Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 1470-4.



## IX. ANHANG

Stamm	Genotyp	Plasmid	Referenz
<i>Aspergillus fumigatus</i> $\Delta$ Ku70 (AfS35)	<i>A. fumigatus</i> D141 $\Delta$ akuA	-	(KRAPPMANN <i>et al.</i> , 2006)
AfS35 <i>gfp-tcsC</i>	<i>gfp-tcsC</i>	pSK379- <i>gfp-tcsC</i>	(SPADINGER & EBEL, 2017)
AfS35 <i>tcsC</i>	<i>tcsC</i>	pSK379- <i>tcsC</i>	Anja Spadinger
AfS35 $\Delta$ <i>tcsC</i>	$\Delta$ <i>tcsC</i>	PCR2.1 <i>tcsC</i> <sub>upstream</sub> -hygro- mycin- <i>tcsC</i> downstream	(MCCORMICK <i>et al.</i> , 2012)
AfS35 $\Delta$ <i>tcsC</i> + <i>gfp-tcsC</i>	<i>gfp-tcsC</i>	PCR2.1 <i>tcsC</i> <sub>upstream</sub> -hygro- mycin- <i>tcsC</i> downstream + pSK379 - <i>gfp-tcsC</i>	(SPADINGER & EBEL, 2017)
AfS35 $\Delta$ <i>tcsC</i> + <i>tcsC</i>	$\Delta$ <i>tcsC</i> + <i>tcsC</i>	PCR2.1 <i>tcsC</i> <sub>upstream</sub> -hygro- mycin- <i>tcsC</i> downstream + pSK379 - <i>tcsC</i>	(MCCORMICK <i>et al.</i> , 2012)

AfS35 $\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC<sub>HAMP1-6</sub></i>	$\Delta tcsC$ + <i>gfp-tcsC<sub>HAMP1-6</sub></i>	PCR2.1 <i>tcsC<sub>upstream</sub></i> - <i>hygro-</i> <i>mycin-</i> <i>tcsC</i> <i>downstream</i> + pSS015- <i>gfp-</i> <i>tcsC<sub>HAMP1-6</sub></i>	(SPADINGER & EBEL, 2017)
AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup></i>	<i>gfp-tcsC<sup>(H771A)</sup></i>	pSK379 <i>gfp-</i> <i>tcsC<sup>(H771A)</sup></i>	(SPADINGER & EBEL, 2017)
AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>109-208</sub></i>	<i>gfp-tcsC<sub>109-208</sub></i>	pAV4	diese Arbeit
<i>Aspergillus nidulans</i> (A26)	FGSC A26	-	(KAEFER, 1965)
A26 $\Delta nikA$	$\Delta nikA$ + $\Delta hygromycin$	-	diese Arbeit
A26 $\Delta nikA$ + <i>gfp</i>	$\Delta nikA$ + $\Delta hygromycin$ + <i>gfp</i>	pSK379- <i>gfp</i> + pSilent	diese Arbeit
A26 <i>tcsC<sub>1-109-gfp</sub></i>	<i>tcsC<sub>1-109-gfp</sub></i>	pAV2 + pSilent	diese Arbeit
A26 <i>gfp-tcsC<sub>1-208</sub></i>	<i>gfp-tcsC<sub>1-208</sub></i>	pSK379 <i>gfp-tcsC<sub>1-</sub></i> <i>208</i> + pSilent	diese Arbeit
A26 <i>gfp-tcsC</i>	<i>gfp-tcsC</i>	pSK379- <i>gfp-</i> <i>tcsC</i> + pSilent	diese Arbeit
A26 $\Delta nikA$ + <i>gfp-tcsC</i>	$\Delta nikA$ + $\Delta hygromycin$ + <i>gfp-tcsC</i>	pSK379- <i>gfp-</i> <i>tcsC</i> + pSilent	diese Arbeit

A26 $\Delta nikA + nikA_{1-124}$ -gfp	$\Delta nikA + \Delta hygromycin + nikA_{1-124}$ -gfp	pAV8 + pSilent	diese Arbeit
A26 $nikA_{1-124}$ -gfp	$nikA_{1-124}$ -gfp	pAV8 + pSilent	diese Arbeit
A26 $tcsC_{1-208}$ -gfp	$tcsC_{1-208}$ -gfp	pAV9 + pSilent	diese Arbeit
A26 $gfp-tcsC_{1-109}$	$gfp-tcsC_{1-109}$	pAV3 + pSilent	diese Arbeit
A26 $gfp-tcsC_{109-208}$	$gfp-tcsC_{109-208}$	pAV4 + pSilent	diese Arbeit
A26 $gfp$	$gfp$	pSK379-gfp + pSilent	diese Arbeit
AfS35 $tcsC_{109-208}$ -gfp	$tcsC_{109-208}$ -gfp	pAV11	diese Arbeit
A26 $nikA_{1-170}$ -gfp	$nikA_{1-170}$ -gfp	pAV15 + pSilent	diese Arbeit
A26 $nikA_{1-124}^{(R94E)}$ -gfp	$nikA_{1-124}^{(R94E)}$ -gfp	pAV16 + pSilent	diese Arbeit
AfS35 $gfp-tcsC_{1-286}$	$gfp-tcsC_{1-286}$	pAV13	diese Arbeit
AfS35 $gfp-tcsC_{1-746}$	$gfp-tcsC_{1-746}$	pAV14	diese Arbeit
A26 $nikA_{1-124}^{(\Delta 92-96)}$ -gfp	$nikA_{1-124}^{(\Delta 92-96)}$ -gfp	pAV18 + pSilent	diese Arbeit
A26 $gfp-nikA$	$gfp-nikA$	pAV17 + pSilent	diese Arbeit
AfS35 $tcsC_{1-162}$ -gfp	$tcsC_{1-162}$ -gfp	pAV12	diese Arbeit
A26 $nikA_{1-124}^{(R94A)}$ -gfp	$nikA_{1-124}^{(R94A)}$ -gfp	pAV23 + pSilent	diese Arbeit
A26 $rfp$	Hygromycin (Resistenzkassette aus pSilent)-rfp	pAV26	diese Arbeit
AfS35 $gfp-tcsC + rfp-stuAC$ -Terminus	$gfp-tcsC + rfp-stuAC$ -Terminus	pSK379-gfp-tcsC + pAV29	diese Arbeit
AfS35 $tcsC$ -gfp	$tcsC$ -gfp	pAV10	diese Arbeit

AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>(D155H)</sup></i>	<i>gfp-tcsC<sup>(D155H)</sup></i>	pAV27	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-Af-cbf5</i>	<i>gfp-Af-cbf5</i>	pAV31	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-109</sub></i>	<i>gfp-tcsC<sub>1-109</sub></i>	pAV3	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>87-162</sub></i>	<i>gfp-tcsC<sub>87-162</sub></i>	pAV60	diese Arbeit
AfS35 <i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ127-137)</sup>-gfp</i>	<i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ127-137)</sup>-gfp</i>	pAV57	diese Arbeit
AfS35 <i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ145-158)</sup>-gfp</i>	<i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(Δ145-158)</sup>-gfp</i>	pAV58	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>natPro</sup></i>	<i>gfp-tcsC<sup>natPro</sup></i>	pAV61	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-tcsC<sub>1-162</sub></i>	<i>gfp-tcsC<sub>1-162</sub></i>	pAV59	diese Arbeit
AfS35 <i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(R129D)</sup>-gfp</i>	<i>tcsC<sub>1-208</sub><sup>(R129D)</sup>-gfp</i>	pAV56	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup></i>	<i>gfp-tcsC<sup>(R129D)</sup></i>	pAV63	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-tcsC<sup>(C447S)</sup></i>	<i>gfp-tcsC<sup>(C447S)</sup></i>	pAV62	diese Arbeit
AfS35 <i>ΔtcsC + gfp-tcsC<sup>(D155H)</sup></i>	<i>ΔtcsC + gfp-tcsC<sup>(D155H)</sup></i>	PCR2.1 <i>tcsC<sub>upstream</sub></i> -hygro- mycin- <i>tcsC</i> downstream + pAV27	diese Arbeit

Tabelle A 1: Verwendete Pilzstämme in TcsC/NikA-Studie

Stamm	Genotyp	Plasmid	Referenz
AfS35 <i>nimA-gfp</i>	<i>nimA-gfp</i>	pSK379 <i>nimA-gfp</i>	(WIEDEMANN <i>et al.</i> , 2016)
AfS35 <i>Δrho4 + nimA-gfp</i>	<i>Δrho4 + nimA-gfp</i>	pSK379 <i>nimA-gfp</i>	Anja Spadinger
AfS35 <i>nimA<sub>296-700</sub>-gfp</i>	<i>nimA<sub>296-700</sub>-gfp</i>	pSK379 <i>nimA<sub>296-700</sub>-gfp</i>	Anja Spadinger
AfS35 <i>nimA<sub>1-301</sub>-gfp</i>	<i>nimA<sub>1-301</sub>-gfp</i>	pSK379 <i>nimA<sub>1-301</sub>-gfp</i>	Anja Spadinger

A26 <i>nimA-gfp</i>	<i>nimA-gfp</i>	pSK379 <i>nimA-gfp</i> + pSilent	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sub>1-601</sub>-gfp</i>	<i>nimA<sub>1-601</sub>-gfp</i>	pAV20	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sub>1-500</sub>-gfp</i>	<i>nimA<sub>1-500</sub>-gfp</i>	pAV19	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sup>(D166A)</sup>-gfp</i>	<i>nimA<sup>(D166A)</sup>-gfp</i>	pAV55	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-nimA<sub>292-378</sub></i>	<i>gfp-nimA<sub>292-378</sub></i>	pAV30	diese Arbeit
AfS35 <i>gfp-nimA<sub>379-700</sub></i>	<i>gfp-nimA<sub>379-700</sub></i>	pAV28	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sup>(K40M)</sup>-gfp</i>	<i>nimA<sup>(K40M)</sup>-gfp</i>	pAV64	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sup>(Y91N)</sup>-gfp</i>	<i>nimA<sup>(Y91N)</sup>-gfp</i>	pAV65	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sub>296-601</sub>-gfp</i>	<i>nimA<sub>296-601</sub>-gfp</i>	pAV66	diese Arbeit
AfS35 <i>nimA<sub>379-700</sub>-gfp</i>	<i>nimA<sub>379-700</sub>-gfp</i>	pAV67	diese Arbeit

**Tabelle A 2: Verwendete Pilzstämme in NimA-Studie**

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz	Abbildung
pSK379	<i>gpdA</i> -Promoter, Pyrithiamin- Resistenzkassette	Sven Krappmann, Würzburg	Anhang A 2
pSK379- <i>gfp</i>	<i>gpdA</i> -Promoter, Pyrithiamin- Resistenzkassette, <i>gfp</i>	Johannes Wagener, München	Anhang A 3
pSilent	Hygromycin- Resistenzkassette	Reinhard Fischer, Karlsruhe	Anhang A 4
PCR2.1 <i>tcsC</i> upstream- <i>hygromycin</i> - <i>tcsC</i> downstream	<i>tcsC</i> flanking regions zur <i>tcsC</i> - Deletion, Hygromycin- Resistenzkassette	(MCCORMICK <i>et al.</i> , 2012)	Anhang A 6
pSS015	<i>tet-on</i> Promoter- Kassette	Johannes Wagener, München	Anhang A 7

**Tabelle A 3: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Sequenz	Konstrukt
GFP in HindIII-FOR	AGTAAGCTTGTTTAA ACATGGTGAGCAAG GGCGAG	pSilent- <i>gfp</i>
GFP in KpnI-REV	AGTGGTACCGATATC ATCTTACTTGTACAG CTGTCCA	pSilent- <i>gfp</i>
RFP in HindIII-FOR	AGTAAGCTTGTTTAA ACATGGCCTCCTCCG AAGACGTC	pSilent- <i>rfp</i>
RFP in KpnI-REV	AGTGGTACCGATATC GGCGCCGGTGGAGT GGCG	pSilent- <i>rfp</i>
TcsC-FOR-Long	ATGACTGGCGCAGA CGAGACGCTCACAG C	pAV2
TcsC AS 1-109 (PmeI)-REV	CCAGAGGACAGGCG AGATAGC	pAV2
TcsC plus G-FOR	GATGACTGGCGCAG ACGAGAC	pAV3, pAV13, pAV14
TcsC AS 1-109-REV	TCAAGAGGACAGGC GAGATAGC	pAV3
TcsC NLS verk.-FOR	GTCTCATGAAGGAG CTGCTTCT	pAV4
Vor HAMP1-Stop-REV	TCACAATGCCCGTCG CGTGTG	pAV4
NikA-FOR	ATGGCTTGCGCGGAC GAG	pAV8, pAV15, pAV17
NikA AS 1-124 (PmeI)-REV	CGAGTCGTAGCTCCT TCTTCCTC	pAV8
TcsC-FOR	ATGACTGGCGCAGA CGAGACG	pAV9, pAV10, pAV12

TcsC AS 1-208 (PmeI)-REV	CCCAATGCCCCGTCGC GTGTG	pAV9, pAV11
TcsC-REV-Long	TCATACGGCCTTTGG AGAGCGATAATCAC TGACCCGT	pAV10
TcsC NLS verk. (PmeI)-FOR	ATGTCTCATGAAGGA GCTGCTTCT	pAV11
TcsC AS 1-162 (PmeI)-REV	CGTCGAGTTCTCGAG TCTACATCATCA	pAV12
HAMP1-REV	CTAACTACCAAAAA CCTGCAGCTGA	pAV13
HAMP6-REV	CTACTGAATACTGTC TCGAAGATTGGA	pAV14
NikA AS 1-170 (PmeI)-REV	CCTGAGAGCCCGTCT TGTTTGCACTT	pAV15
NikA (EcoRV)-REV	TCATGGTCTTACCCT ATCTATGGAGAG	pAV17
Del. AS 92-96 NikA-FOR	TCTTCCAAAGATACA GAACC	pAV18
Del. AS 92-96 NikA-REV	AAGATGTTGCGTGTG CTC	pAV18
<i>gpdA</i> (p)-FOR	GCGAATTCCTTTGCC CGGTGTATGAAACC	pAV21
pSK379 Umbau-REV	ATGACTCACTACCCG AATGGG	pAV21
NikA Sub. AS 94 (R-E)-FOR	TCTTCATAAAGAGAG AAAGTCTTCCAAAG ATACAGAACCTGAG ATTCTC	pAV16
NikA Sub. AS 94 (R-A)-FOR	TCTTCATAAAGCGAG AAAGTCTTCCAAAG ATACAGAACCTGAG ATTCTC	pAV23

NikA Sub. AS 94-REV	TGTTGCGTGTGCTCG GCA	pAV16, pAV23
pSilent Hyg-FOR	GCCGCGACGTAACT GATATT	pAV24
pSilent Hyg-REV	GCCAAGAGCGGATT CCTCAG	pAV24
RFP-FOR	AAACATGGCCTCCTC CGAGGACGTC	pAV 26
RFP (EcoRV)-REV	AGCGATATCTTAGGC GCCGGTGGAGTGGC G	pAV 26
TcsC Sub. AS 155 (D-H)-FOR	CGACAGTGATCATG ATGTAGACTCGAGA A	pAV27
TcsC Sub. AS 155 (D-H)-REV	TCGTCATCGAGCGCC TCA	pAV27
StuA <sub>C</sub> -Terminus (EcoRV)- FOR	ATGTCCTACACCTAC ACCA	pAV29
StuA <sub>C</sub> -Terminus (EcoRV)- REV	TCATCGACGACGAG GCATG	pAV29
Af-Cbf5-FOR	GATGGCAGTCTCAGT GACTAAG	pAV31
Af-Cbf5-REV	CTAGTCGCTGTCATC ACTGTC	pAV31
Sub AS 129 TcsC R-D FOR	TTCAAGACGTGATCA GAGAACAAGGAGAA TCCG	pAV56, pAV63
Sub AS 129 TcsC R-D REV	GTTTCCTGCTGCATG CCG	pAV56, pAV63
Deletion AS 127- 137 TcsC	FOR/GAAGCGGAAGA CAATGAG	pAV57
Deletion AS 127- 137 TcsC-REV	TGAAGTTTCCTGCTG CATG	pAV57



Deletion AS 145-158 TcsC	TCGAGAACTCGACTC GTTC	pAV58
Deletion AS 145-158 TcsC-REV	AGCCTCATTGTCTTC CGC	pAV58
TcsC 1-162 in EcoRV-FOR	GATGACTGGCGCAG ACGAGA	pAV59, pAV60
TcsC 1-162 in EcoRV-REV	CTATCGAGTTCTCGA GTCTACATCATCATC	pAV59
TcsC ab AS 87 in EcoRV-FOR	GATGGAGTTACCTTT GTCTTCCACC	pAV60
TcsC-1000BP-up-FOR	CTCCTCCTCATTATC ATC	pAV61
TcsC-upstream-REV	TGTGTCTGTTGTAAA TTAGTTAAC	pAV61
Sub TcsC AS 447 (C-S)-FOR	TCAAGCCAACTCCAA GGGGGAAA	pAV62
Sub TcsC AS 447 (C-S)-REV	ACCTTCTGTGTCAGA TCACC	pAV62

**Tabelle A 4: Verwendete Oligonukleotide für TcsC/NikA-Studie**

Bezeichnung	Sequenz	Konstrukt
NimA-Kinase Subst. D zu A-FOR	CTGCATCGTGCCTTG AAGCCC	pAV55
NimA-Kinase Subst. D zu A-REV	GATAGTCATCTGCGC CTG	pAV55
NimA C-Terminus FOR	GCAGGAAAGAGTGA ACATCGAA	pAV28
NimA-REV Stop	CTACCTGAAGTTTCG AATGACC	pAV28

NimA coiled coil-FOR	GCTTCCTATCATTCG CCTGAT	pAV30
NimA coiled coil- REV Stop	CTATACCTCGAACTC AAACCT	pAV30
GFP-FOR	ATGGTGAGCAAGGG CGAGGAG	pAV19, pAV20, pAV66
NimA-200AS-REV	CTCCCACTTCGCCCCG CTGTTT	pAV19
NimA-100AS-REV	AGTTGGGGACCCGG CATCA	pAV20, pAV66
NimA Sub 166-FOR	CTGCATCGTGCCTTG AAGCCC	pAV55
NimA Sub 166-REV	GATAGTCATCTGCGC CTG	pAV55
NimA Sub AA 40 (K zu M)-FOR	ACTGTGTCGCATGGA AATCAATTACG	pAV64
NimA Sub AA 40 (K zu M)-REV	ATCTAGCTTGTTGAT TAGC	pAV64
NimA Sub AA 91 (Y zu N)-FOR	GTACATGGAAACT GTGGCGGTG	pAV65
NimA Sub AA 91 (Y zu N)-REV	AGGTACAGATCCTG GCTC	pAV65
<i>gpdA</i> -Ende-REV	AAACGGTGATGTCTG CTCAAG	pAV67
NimA C-Terminus + Startcodon-FOR	ATGCAGGAAAGAGT GAACATCGAA	pAV67

**Tabelle A 5: Verwendete Oligonukleotide in NimA-Studie**

Bezeichnung	Konstrukt	Vektor/ Schnittstelle(n)	Quelle
pSK379- <i>gfp</i> - <i>tesC</i>	pSK379- <i>gfp::tesC</i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	(SPADINGER & EBEL, 2017)

pSK379- <i>tcsC</i>	pSK379:: <i>tcsC</i>	pSK379/NsiI	(MCCORMICK <i>et al.</i> , 2012)
pSS015- <i>gfp</i> - <i>tcsC<sub>HAMP1-6</sub></i>	pSS015:: <i>gfp</i> + <i>tcsC<sub>HAMP1-6</sub></i>	pSS015/EcoRV (GFP) + PmeI (Tcs <sub>HAMP1-6</sub> )	(SPADINGER & EBEL, 2017)
pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC<sub>1-208</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-208</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	Anja Spadinger
pAV2	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-109</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV3	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-109</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV4	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>109-208</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV7	pSilent:: <i>gfp</i>	pSilent/HindII + KpnI	diese Arbeit
pAV8	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>nikA<sub>1-124</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV9	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-208</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV10	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC</i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV11	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>109-208</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV12	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-162</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV13	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-286</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV14	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC<sub>1-746</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV15	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>nikA<sub>1-170</sub></i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	diese Arbeit
pAV17	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>nikA</i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit

pAV24 (pSK379- <i>hygromycin</i> )	pAV21:: Hygromycin- Resistenzkassette aus pSilent	pAV21 (linear)	diese Arbeit
pAV 26	pAV24:: <i>rfp</i>	pAV24/PmeI	diese Arbeit
pAV29	pAV26:: <i>stuA</i> <sub>C-Terminus</sub>	pAV26/EcoRV	diese Arbeit
pAV31	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>Af-cbf5</i>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV59	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC</i> <sub>1-162</sub>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV60	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>tcsC</i> <sub>87-162</sub>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV61	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> ::1 kb upstream von <i>tcsC</i> ( <i>tcsC</i> <sup>natPro</sup> )	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> / PmeI	diese Arbeit
Bezeichnung	Konstrukt	Vektor/ Mutation	Quelle
pAV16	pAV8 ( <i>nikA</i> <sup>R94E</sup> )	pAV8/ <i>nikA</i> <sup>(R94E)</sup>	diese Arbeit
pAV18	pAV8 ( <i>nikA</i> <sup>Δ92-96</sup> )	pAV8/ <i>nikA</i> <sup>(Δ92-96)</sup>	diese Arbeit
pAV21	pSK379 (Pyrithiamin- Resistenzkassetten- Deletion)	pSK379/ Pyrithiamin- Resistenzkassetten- Deletion	diese Arbeit
pAV23	pAV8 ( <i>nikA</i> <sup>R94A</sup> )	pAV8/ <i>nikA</i> <sup>(R94A)</sup>	diese Arbeit
pAV27	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> ( <i>tcsC</i> <sup>D155H</sup> )	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> / <i>tcsC</i> <sup>(D155H)</sup>	diese Arbeit
pAV56	pAV9 ( <i>tcsC</i> <sup>R129D</sup> )	pAV9/ <i>tcsC</i> <sup>(R129D)</sup>	diese Arbeit
pAV57	pAV9 ( <i>tcsC</i> <sup>Δ127-137</sup> )	pAV9/ <i>tcsC</i> <sup>(Δ127-137)</sup>	diese Arbeit
pAV58	pAV9 ( <i>tcsC</i> <sup>Δ145-158</sup> )	pAV9/ <i>tcsC</i> <sup>(Δ145-158)</sup>	diese Arbeit
pAV62	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> ( <i>tcsC</i> <sup>C447S</sup> )	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> / <i>tcsC</i> <sup>(C447S)</sup>	diese Arbeit
pAV63	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> ( <i>tcsC</i> <sup>R129D</sup> )	pSK379- <i>gfp</i> - <i>tcsC</i> / <i>tcsC</i> <sup>(R129D)</sup>	diese Arbeit

Tabelle A 6: Verwendete Plasmidkonstrukte in TcsC/NikA-Studie

Bezeichnung	Konstrukt	Vektor/ Schnittstelle(n)	Quelle
pSK379 <i>nimA-gfp</i>	pSK379- <i>gfp</i> :: <i>nimA</i>	pSK379- <i>gfp</i> /PmeI	(WIEDEMANN <i>et al.</i> , 2016)

pAV28	pSK379- <i>gfp::nimA</i> <sub>379-700</sub>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
pAV30	pSK379 <i>gfp::</i> <i>nimA</i> <sub>292-378</sub>	pSK379- <i>gfp</i> /EcoRV	diese Arbeit
Bezeichnung	Konstrukt	Vektor/ Mutation	Quelle
pAV19	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>Δ501-700</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(Δ501-700)</sup>	diese Arbeit
pAV20	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>Δ602-700</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(Δ602-700)</sup>	diese Arbeit
pAV55	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>D166A</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(D166A)</sup>	diese Arbeit
pAV64	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>K40M</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(K40M)</sup>	diese Arbeit
pAV65	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>Y91N</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(Y91N)</sup>	diese Arbeit
pAV66	pSK379 <i>nimA</i> <sub>296-700</sub> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>Δ602-700</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> <sub>296-700</sub> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(Δ602-700)</sup>	diese Arbeit
pAV67	pSK379 <i>nimA</i> <sub>296-700</sub> - <i>gfp</i> ( <i>nimA</i> <sup>Δ262-378</sup> )	pSK379 <i>nimA</i> <sub>296-700</sub> - <i>gfp</i> / <i>nimA</i> <sup>(Δ262-378)</sup>	diese Arbeit

Tabelle A 7: Verwendete Plasmidkonstrukte in NimA-Studie

Afumigatus MTGADETLTAASAILQTLARGPDASISDP---NSSHKTNGCDTKFAKLPGEPSQAKAA 56  
Aterreus MAGADETLAAAAAILQGLARESP-SGTAPPFDFQFSLPPANGYDAKISKLPGDPSPAKAA 59  
Aoryzae MAGADETLAAAAAILRGLARETPRSGSAPPFFDFPLSHASSNGYDTKVTKLPGDASSSKAA 60  
Anidulans MACADETLTAAAI IQNLVREAPSS-GSPSFEFNFSPQSTNGVD-SLPKLPGEPSIAKVR 58  
Aniger MAGADETLAAAAAILRGLAKETPSS-SAPPFDFEFSHPPANGYDTKLAKLPGETSSAKAA 59  
\*: \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*: \*.: \* \* \* :\*\*\* \* .. \*\*\*\*\*: \* :\*.

Afumigatus FEFELEALIRRVRHLEFQVVSHPYPRPA-P---ELPLSSTKNSDFLWFLGSLRLSSHE 111  
Aterreus FESELEALVRRRIHHLEFQTVSHQSPSPGISPDASGSALQPSRGEAGFLWSFGLSRPHSRQ 119  
Aoryzae FENELEALVRRVQRLESQAQ----- 80  
Anidulans FENELEALVRRIRHMEVQSQQNHTQH----- 84  
Aniger FEQELEALVRRVRHLEFQNHQKTTQQ----- 85  
\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*: \* \*

Afumigatus GAASNSSCGMQQETSRRRQTRIRREAEDNEAALDDDD--SDDVSRTRLVREEDI 169  
Aterreus N--SNESSTLQQNSHPQTRTRTGAEPE--EREDLEEDDSDEEELSRTRLVREEDI 175  
Aoryzae -----QNSRPHHPR-----IE--EPDEDIEEESDEDEDLSRTRLVREEDI 122  
Anidulans -----AEHTQLHKKRRSSKDTPEILDESOGAASDEL-FEEGATTVREEDI 131  
Aniger -----QQQQQPHGSRNSAIEPEDHEVEDIDDEESDEDEELNSRTRLVREEDI 133  
\*\* \* : : : : \* \*\*\*\*\*

Afumigatus SYLRNHVQKQAEIISFQKDIIAQVRDELQQQEEHTRRALTKVENEDVLLERELRKHQA 229  
Aterreus SYLRNHVQKQAEIISFQKDIIAQVRDELQQQEEQTRRALTKVENEDVLLERELRKHQA 235  
Aoryzae SYLRNHVQKQAEIISFQKDIIAQVRDELQQQEEQTRRALTKVENEDVLLERELRKHQA 182  
Anidulans SYLRNVQKQAEIISFQKNIITQVREELQLQEVQTRRALTKVENEDVLLERELRKHQA 191  
Aniger SYLRNHVQKQAEIISFQKDIIAQVRDELQQQEEQTRRALTKVENEDVLLERELRKHQA 193  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*: \* \* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus NEAFQKALREIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVS 289  
Aterreus NEAFQKALREIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVS 295  
Aoryzae NEAFQKALREIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVS 242  
Anidulans NEAFQKALREIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVS 251  
Aniger NEAFQKALREIGGIITQVANGDLSMKVQIHPLEMDPEIATFKRTINTMMDQLQVFGSEVS 253  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus RVAREVGTGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTDQVREIAAVTTAVAHGDLSQ 349  
Aterreus RVAREVGTGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTDQVREIAAVTTAVAHGDLSQ 355  
Aoryzae RVAREVGTGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTDQVREIAVTTAVAHGDLSQ 302  
Anidulans RVAREVGTGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTDQVREIAVTTAVAHGDLSQ 311  
Aniger RVAREVGTGILGGQAQITGVHGIWKELTENVNIMAKNLTDQVREIAAVTTAVAHGDLSQ 313  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus KIESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGLGGQAQIEGVQGMWNEL 409  
Aterreus KIESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGLGGQAQIEGVQGMWNEL 415  
Aoryzae KIESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGLGGQAQIDGVKGMWNEL 362  
Anidulans KIESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGLGGQAQIEGVQGMWNEL 371  
Aniger KIESRAQGEILELQQTINTMVDQLRTFATEVTRVARDVGTEGLGGQAQIEGVQGMWNEL 373  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus TVNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFA 469  
Aterreus TVNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFA 475  
Aoryzae TVNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFA 422  
Anidulans TVNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFA 431  
Aniger TVNVNAMANNLTQVRDIATVTKAVAKGDLTQKVQANCKGEIAELKNIINSMVDQLRQFA 433  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus QEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANNLTQVREIADVTAVAKG 529  
Aterreus QEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANNLTQVREIADVTAVAKG 535  
Aoryzae QEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANNLTQVREIADVTAVAKG 482  
Anidulans QEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANNLTQVREIADVTAVAKG 491  
Aniger QEVTKIAKEVGTDGVLGGQATVNDVEGTWKDLTENVNRMANNLTQVREIADVTAVAKG 493  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus DLTKKV TANVQGEILD LKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTGDTLGGQAKVDNVEGK 589  
Aterreus DLTKKV TANVQGEILD LKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTGDTLGGQAKVDNVEGK 595  
Aoryzae DLTKKV TANVQGEILD LKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTGDTLGGQAKVDNVEGK 542  
Anidulans DLSKKV TANVQGEILD LKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTGDTLGGQAKVDNVEGK 551  
Aniger DLTKKV TANVQGEILD LKSTINGMVDRLNTFAFEVSKVAREVGTGDTLGGQAKVDNVEGK 553  
\*\*.:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Afumigatus WKDLTDNVNTMAQNLTQSQRSISDVTQAIAGDLSKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRL 649  
Aterreus WKDLTDNVNTMAQNLTQSQRSISDVTQAIAGDLSKKIQVHAQGEILTLKVTINHMVDRL 655  
Aoryzae WKDLTDNVNTMAQNLTQSQRSISDVTQAIAGDLSKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRL 602  
Anidulans WKDLTDNVNTMAQNLTQSQRSISDVTQAIAGDLSKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRL 611  
Aniger WKDLTDNVNTMAQNLTQSQRSISDVTQAIAGDLSKKIEVHAQGEILTLKVTINHMVDRL 613  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

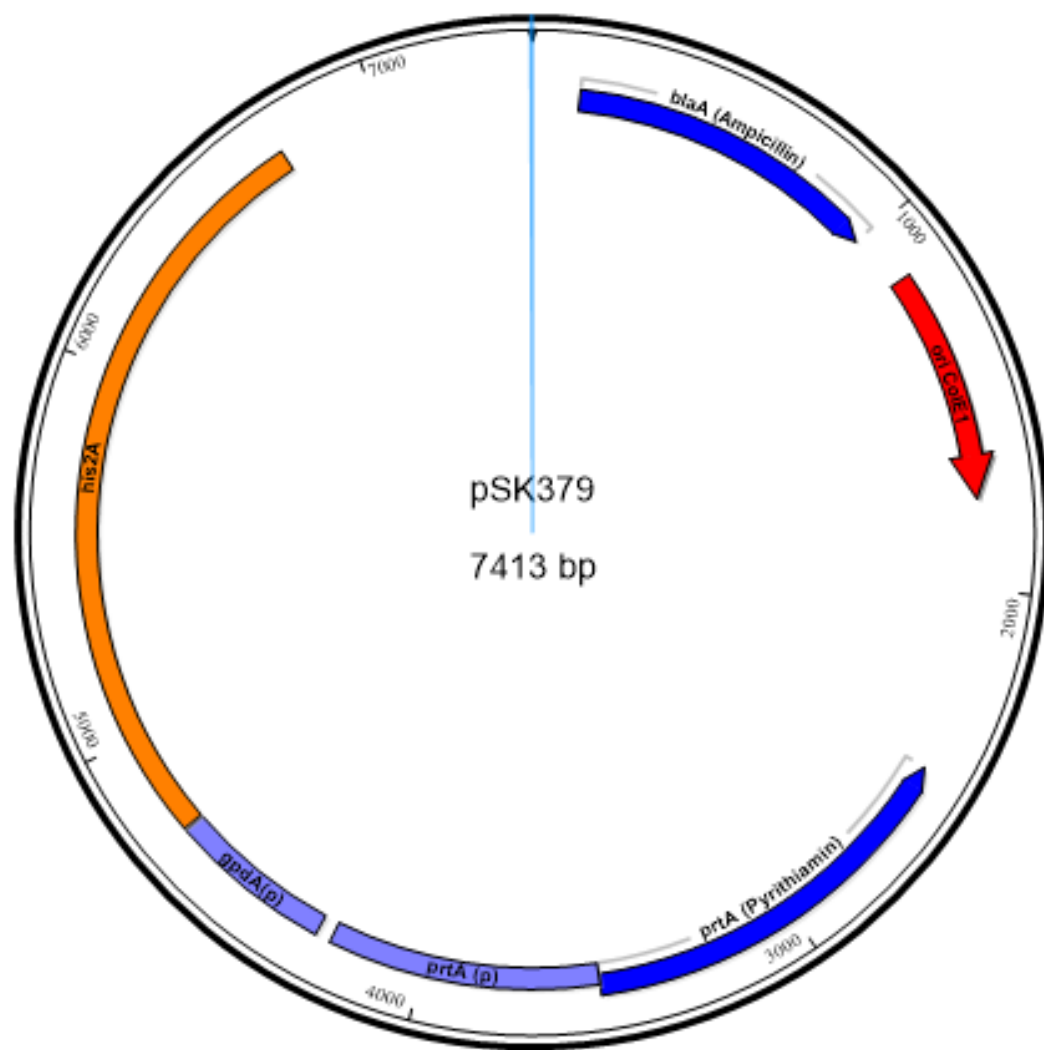
Afumigatus	AKFATELKKVARDVGVDGKMGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQVRAFGEITDA 709
Aterreus	AKFATELKKVARDVGVDGKMGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQVRAFGEITDA 715
Aoryzae	AKFATELKKVARDVGVDGKMGQANVEGIAGTWKEITEDVNIMAENLTSQVRAFGEITDA 662
Anidulans	AKFATELKKVARDVGVDGKMGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQVRAFGEITDA 671
Aniger	AKFATELKKVARDVGVDGKMGQANVEGIAGTWKEITEDVNTMAENLTSQVRAFGEITDA 673 *****
Afumigatus	ATDGDFTKLITVNASGEMDELKRRKINKMVSNLRDSIQRNTAAREAAELANRTKSEFLANM 769
Aterreus	ATDGDFTKLITVNASGEMDELKRRKINKMVSNLRDSIQRNTAAREAAELANRTKSEFLANM 775
Aoryzae	ATDGDFTKLITVNASGEMDELKRRKINKMVSNLRDSIQRNTAAREAAELANRTKSEFLANM 722
Anidulans	ATDGDFTKLITVNASGEMDELKRRKINKMVSNLRDSIQRNTAAREAAELANRTKSEFLANM 731
Aniger	ATDGDFTKLITVNASGEMDELKRRKINKMVSNLRDSIQRNTAAREAAELANRTKSEFLANM 733 *****
Afumigatus	SHEIRTPMNGIIGMTQLTDLTDLKPYPREMLNVVHNLANSLLTIIDDILDISKIEANRM 829
Aterreus	SHEIRTPMNGIIGMTQLTDLTDLKPYPREMLNVVHNLANSLLTIIDDILDISKIEANRM 835
Aoryzae	SHEIRTPMNGIIGMTQLTDLTDLKPYPREMLNVVHNLANSLLTIIDDILDISKIEANRM 782
Anidulans	SHEIRTPMNGIIGMTQLTDLTDLKPYPREMLNVVHNLANSLLTIIDDILDISKIEANRM 791
Aniger	SHEIRTPMNGIIGMTQLTDLTDLKPYPREMLNVVHNLANSLLTIIDDILDISKIEANRM 793 *****
Afumigatus	VIESIPFTVRGTVFNALKTLAVKANEFSLTYQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGN 889
Aterreus	VIESIPFTVRGTVFNALKTLAVKANEFSLTYQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGN 895
Aoryzae	VIESIPFTVRGTVFNALKTLAVKANEFSLTYQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGN 842
Anidulans	VIESIPFTVRGTVFNALKTLAVKANEFSLTYQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGN 851
Aniger	VIESIPFTVRGTVFNALKTLAVKANEFSLTYQVDNTVPDYVIGDPFRLRQIILNLVGN 853 *****
Afumigatus	AIKFTEHGEVKLTIRKSDREQCAENEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTT 949
Aterreus	AIKFTEHGEVKLTIRKSDREQCAENEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTT 955
Aoryzae	AIKFTEHGEVKLTIRKSDREQCAENEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTT 902
Anidulans	AIKFTEHGEVKLTICKSDREQCAENEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTT 911
Aniger	AIKFTEHGEVKLTICKSDREQCAENEYAFEFVSVDTGIGIEEDKLDLIFDTFQQADGSTT 913 *****
Afumigatus	RRFGGTGLGLSISKRLVNLMGDVMVWTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQLLPYK 1009
Aterreus	RRFGGTGLGLSISKRLVNLMGDVMVWTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQLLPYK 1015
Aoryzae	RRFGGTGLGLSISKRLVNLMGDVMVWTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQLLPYK 962
Anidulans	RRFGGTGLGLSISKRLVNLMGDVMVWTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQLLPYK 971
Aniger	RRFGGTGLGLSISKRLVNLMGDVMVWTSEYGHGSTFHFTCVVKLADQSLNVIASQLLPYK 973 *****
Afumigatus	HHRVLFIDKQGNGLAENI IKMLKQLELEPIVVRDEDHVPPPEIQDPSGKESGHAYDVII 1069
Aterreus	NHRVLFIDKGENGAQAENVLMKMLKQIDLEPLVVRNEDHVPPPEIQDPSGKESGHAYDVII 1075
Aoryzae	NHRVLFIDKGENGTQADNVMMKMLKQMDLEPLVVRNEDHVPPPEIQDPSGKESGHAYDVII 1022
Anidulans	NHRVLFIDKGENGPEAENVLMKMLKQIDLEPLVVRNEDHVPPPEIQDPSGKESGHAYDVII 1031
Aniger	NHRVLFIDKGENGQAENVMMKMLKQIDLEPLVVRNEDHVPPPEIQDPSGKESGHAYDVII 1033 :*****: * :*: :*: :*: :*: :*: :*
Afumigatus	VDSVDTARLLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCQPIDLNGMLPA 1129
Aterreus	VDSVATARLLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCQPIDLNGMLPA 1135
Aoryzae	VDSVGTARLLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCQPIDLNGMLPA 1082
Anidulans	VDSVNTARMLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCEPIDLNGMLPA 1091
Aniger	VDSVATARLLRTYDDFKYVPIVLCPLVCVSLKSALDLGISSYMTTPCQPIDLNGMLPA 1093 *** :*: :*: :*
Afumigatus	LEGRSTPITTDHSRSDILLAEDNDVNQKLAVKILEKHNHNVSVVGNGLAEAVEAVKKRRY 1189
Aterreus	LEGRSTPITTDHSRSDILLAEDNDVNQRLAVKILEKHNHNVSVVSNGLAEAVEAVKQRRY 1195
Aoryzae	LEGRSTPITTDHSRSDILLAEDNDVNQKLAVKILEKHNHNVSVVSNGLAEAVEAVKQHRV 1142
Anidulans	LEGRSTPITTDHSRSDILLAEDNDVNQKLAVKILEKHNHNVSVVGNGLAEAVEAVKQRRY 1151
Aniger	LEGRSTPITTDHSRSDILLAEDNDVNQKLAVKILEKHNHNVSVVSNGLAEAVEAVKQRRY 1153 *****:*****:***.*****: :*
Afumigatus	DVILMDVQMPVMGGFEATGKIREYEREAGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLS 1249
Aterreus	DVILMDVQMPVMGGFEATGKIREYERESGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLS 1255
Aoryzae	DVILMDVQMPVMGGFEATGKIREYERESGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLS 1202
Anidulans	DVILMDVQMPVMGGFEATGKIREYERESGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLS 1211
Aniger	DVILMDVQMPVMGGFEATGKIREYERESGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAQMDEYLS 1213 *****:*****
Afumigatus	KPLKQNQMMQTILKCATLGGSLLSKESKESRLSSSGEIHHS-----EGKRPGMETRISI 1302
Aterreus	KPLKQNQMMQTILKCATLGGSLLSKESKESRISSSGEMHPVHSGADGKS-PRPSMETRISI 1314
Aoryzae	KPLKQNQMMQTILKCATLGGSLLSKESKESRISSSGEMHPVHH-GPDGKG-SRPGMEGRSI 1260
Anidulans	KPLKQNQMMQTILKCATLGGSLLSKESKESRISSSGEMHHVH-TGPDGKS-QRPGMEGRSI 1269
Aniger	KPLKQNQMMQTILKCATLGGSLLSKESKESRISSSGEMHPVHSGPDGKSQQRPGLEPRSV 1273 *****:*****: * :*: *

Afumigatus	TASGSIDRG--FSSPAAAKDDEIAMERVSDYRSPKAV*-----	1337
Aterreus	TATSSVNRG-SLASPNTDKGEDLAMERVNAARPFR-----	1348
Aoryzae	TASSTVNRG-SLASPNVEKAEDLSMERALLRSNSS*-----	1294
Anidulans	TSSSATSR--TLASTSAERTEQLSIDRVRP*-----	1297
Aniger	TATSTINRGGGLASPNVDRADELAVERVSFTPAQLRKESLSY*	1315

**Abbildung A 1: Aminosäuresequenz-Alignment der zu TcsC aus *A. fumigatus* homologen Proteine aus *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. nidulans* und *A. niger***

Grüne Markierung:	basische Aminosäuren
Rote Markierung:	saure Aminosäuren
.	ähnliche Aminosäuren
:	sehr ähnliche Aminosäuren
*	identische Aminosäuren





### Abbildung A 2: pSK379

Das Plasmid pSK379 beinhaltet eine Gensequenz des Histon 2A-Lokus von AfS35, genannt *his2A*, womit eine homologe Integration der Gensequenzen des Plasmids in das Chromosom des Pilzes ermöglicht wird.

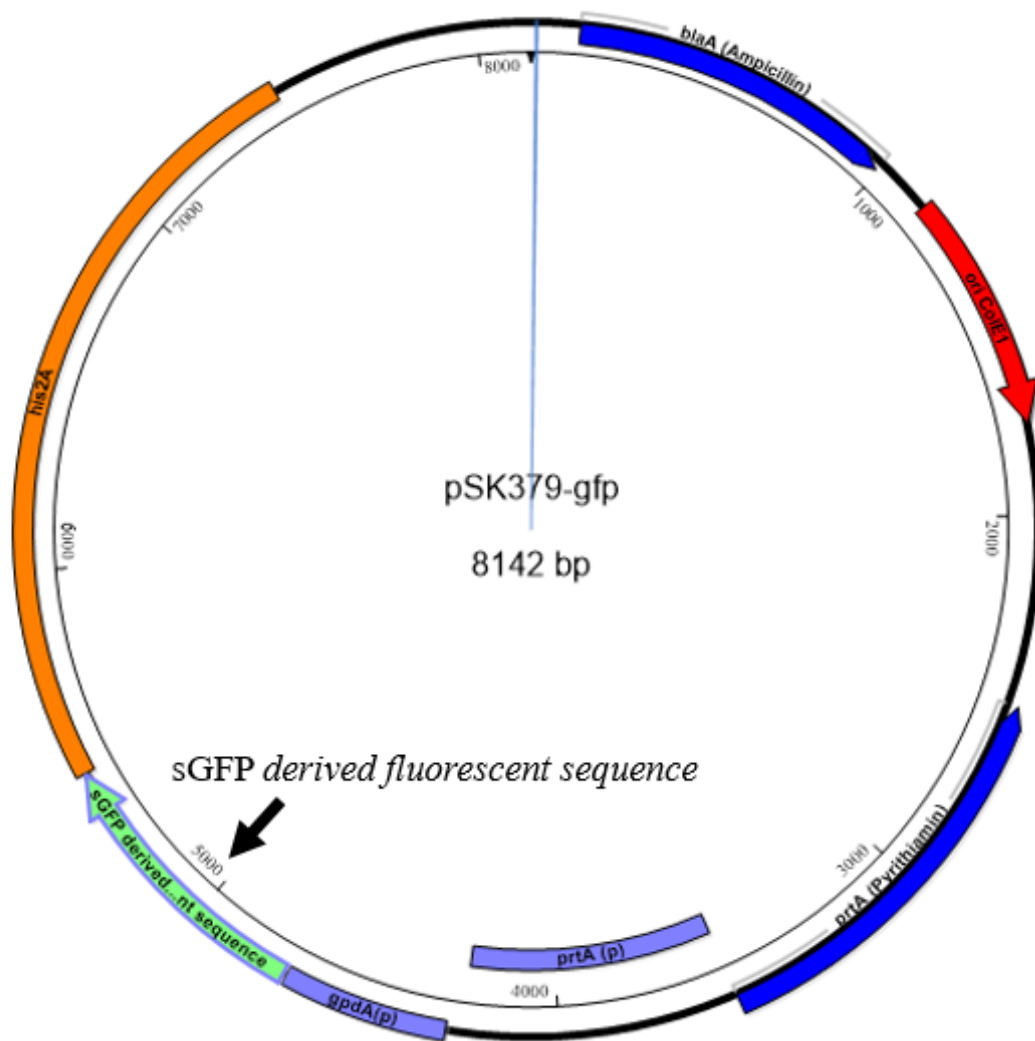


Abbildung A 3: pSK379-gfp

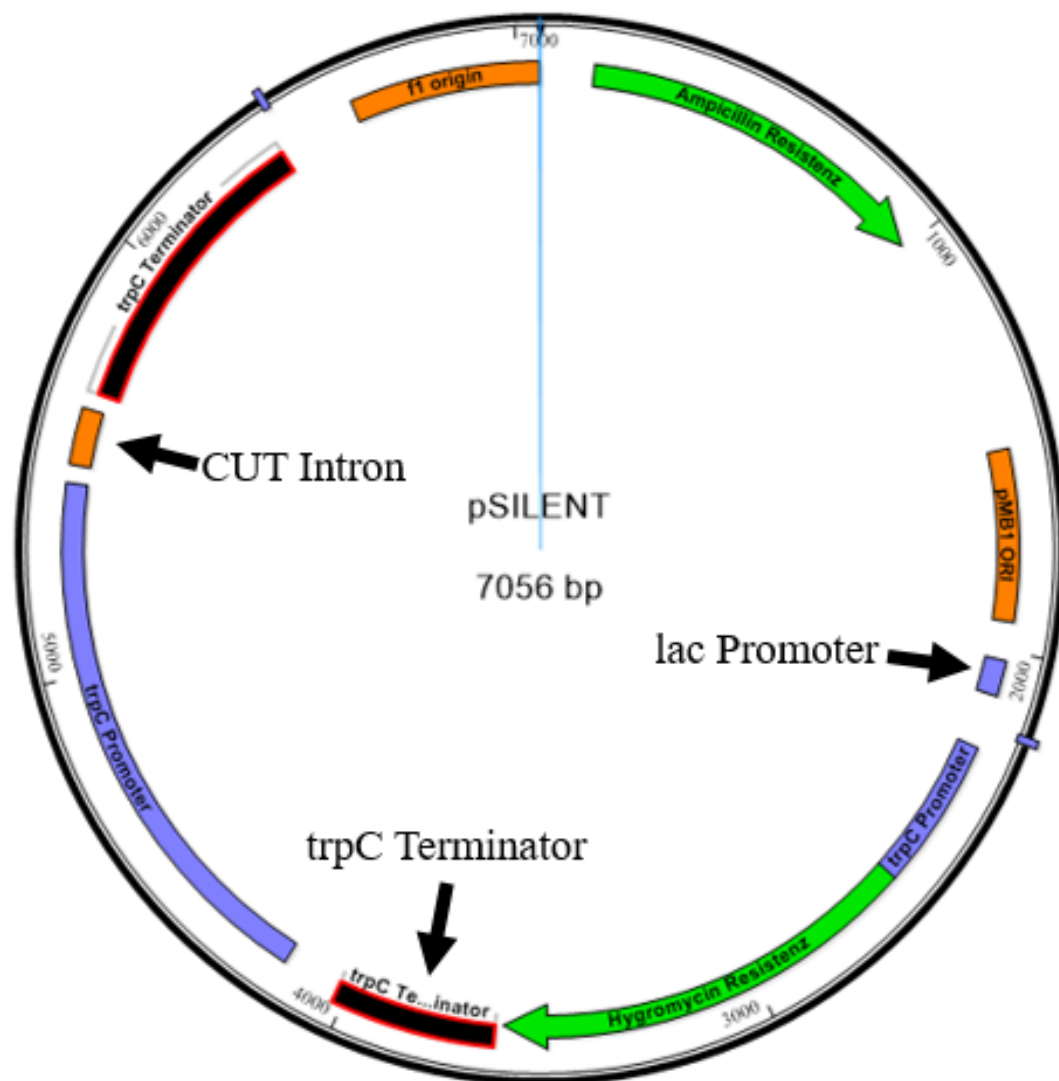
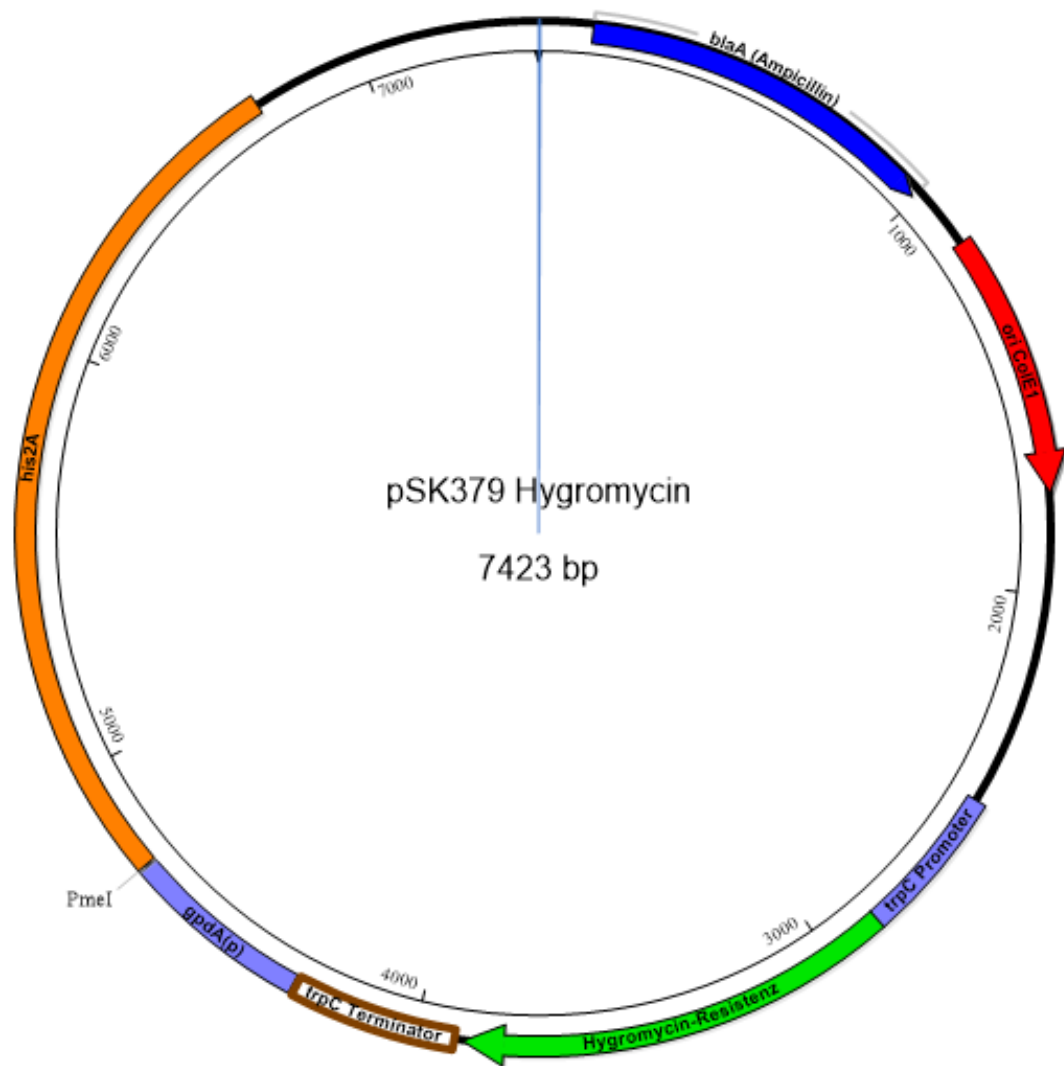
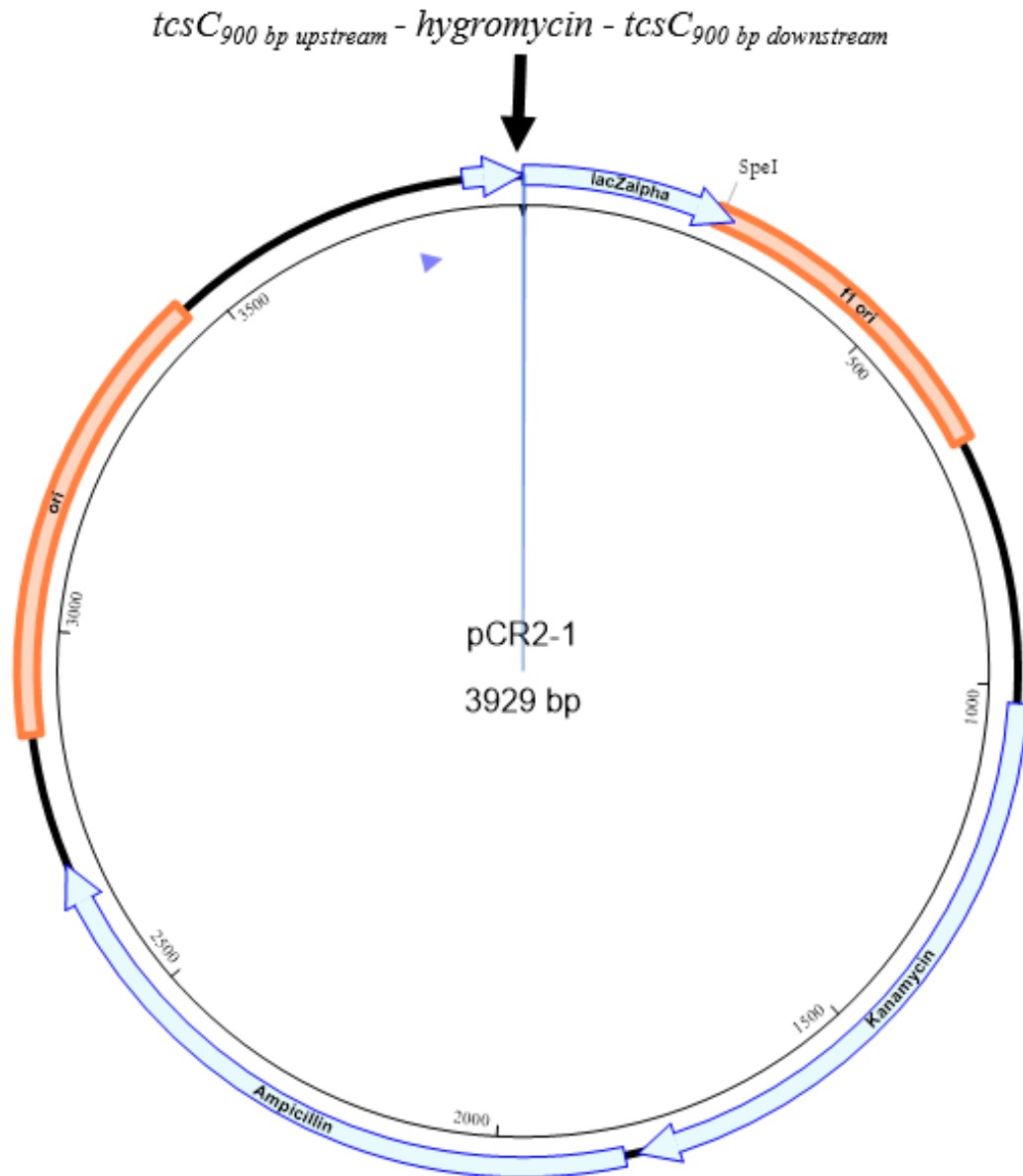


Abbildung A 4: pSilent



**Abbildung A 5: pSK379-hygromycin (pAV24)**

Die in pSK379 enthaltene Pyrithiamin-Resistenzkassette wurde deletiert und durch eine aus pSilent amplifizierte Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.



**Abbildung A 6: pCR2.1 *tcsC* upstream-hygromycin-*tcsC* downstream**

In den kommerziellen Vektor pCR 2.1 wurde ein Ligationsfragment bestehend aus *tcsC*<sub>900 bp upstream</sub>, der Hygromycin-Resistenzkassette aus pSK346 und *tcsC*<sub>900 bp downstream</sub> kloniert. Für die Transformation in AfS35 wurde das Plasmid zuvor mittels SpeI linearisiert (MCCORMICK *et al.*, 2012).

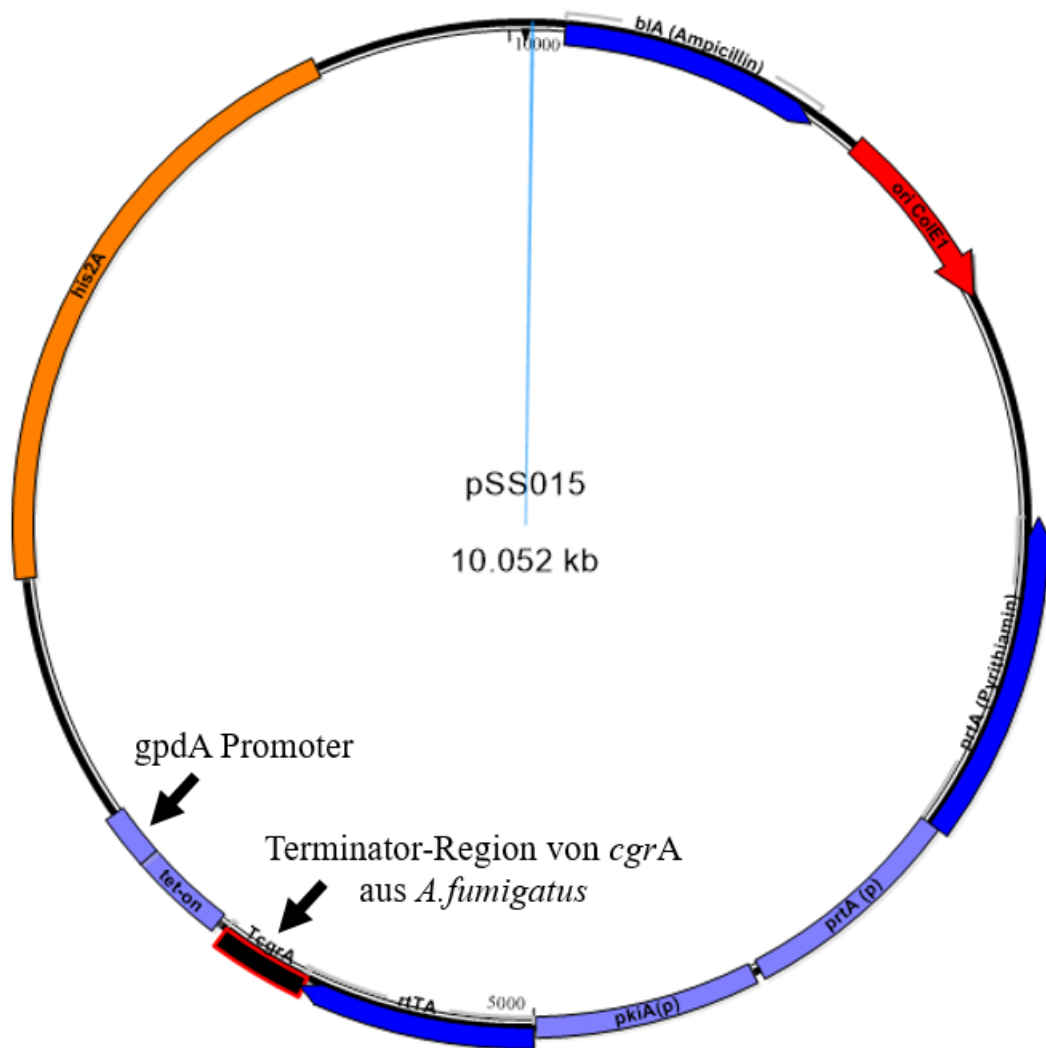
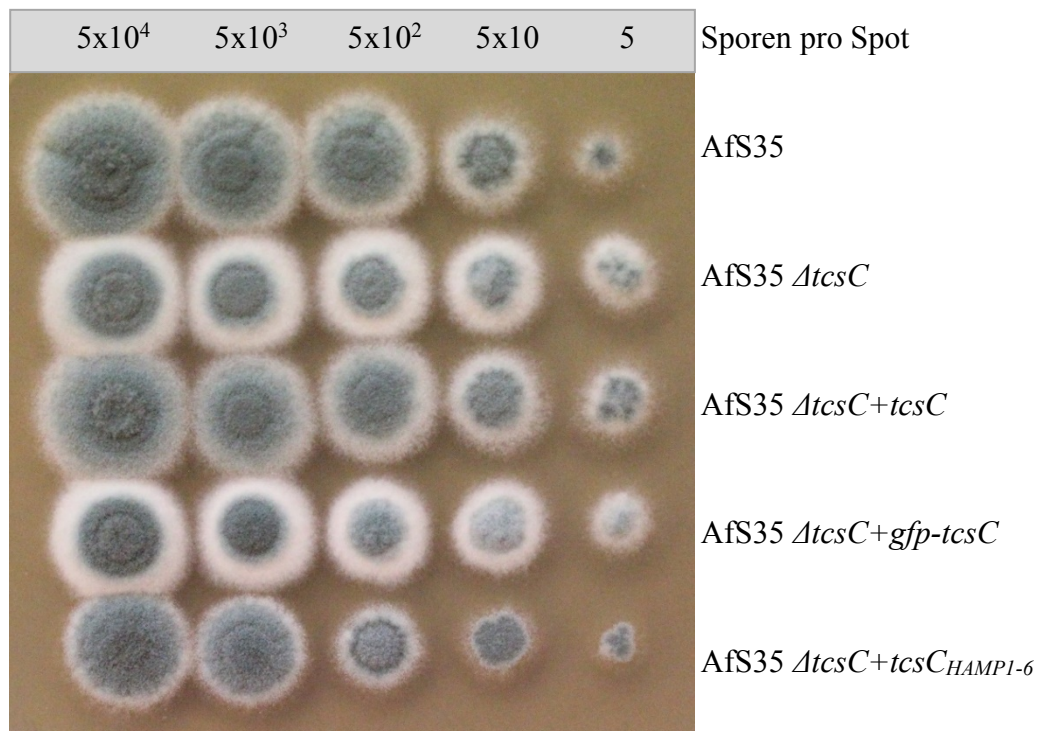
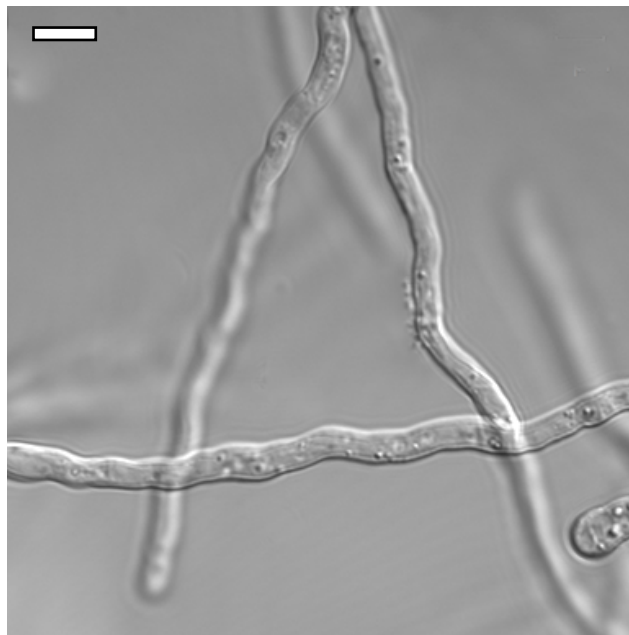


Abbildung A 7: pSS015



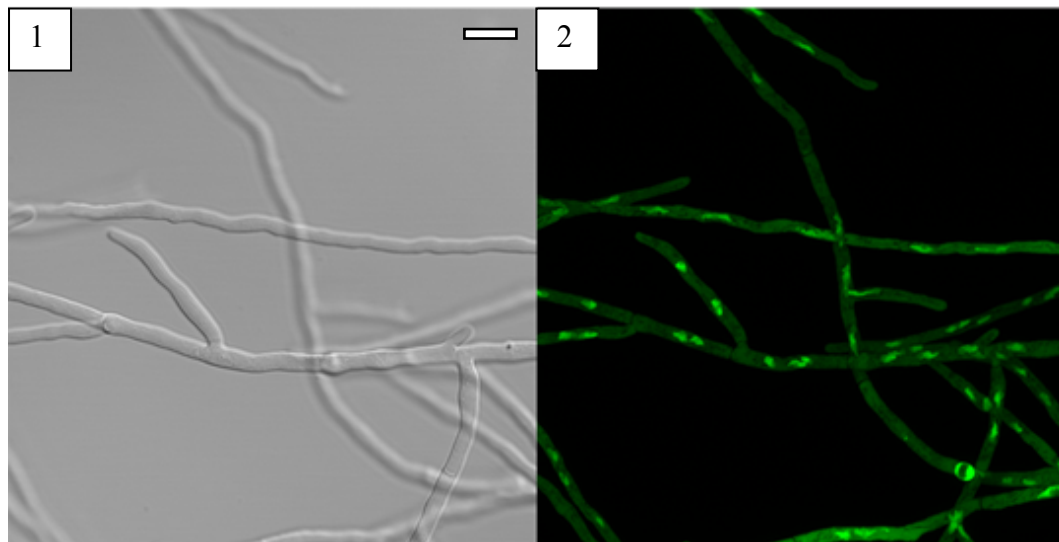
**Abbildung A 8: Tüpfeltest auf AMM-Agar mit 100 µg/ml Doxycyclin**



**Abbildung A 9: AfS35 *gfp-tcsC* + *rfp-stuAC*-Terminus**

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop; *Bright Field (Single Plane)*

Maßstab: 5 µm



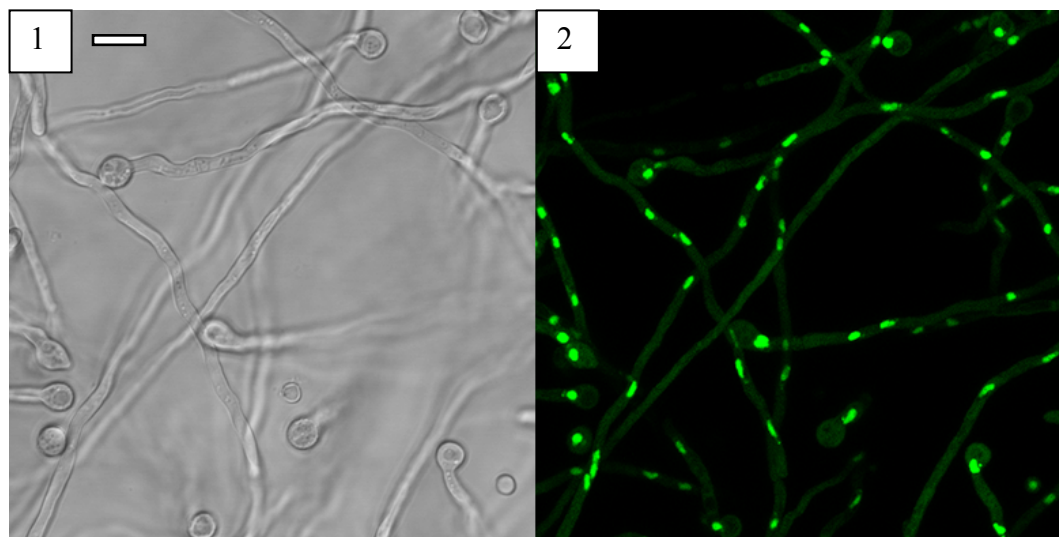
**Abbildung A 10: A26 *nikA-gfp***

Aufnahme an konfokalem Mikroskop, fixiertes Präparat

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



**Abbildung A 11: A26  $\Delta nikA$  + *nikA*<sub>1-170</sub>-*gfp***

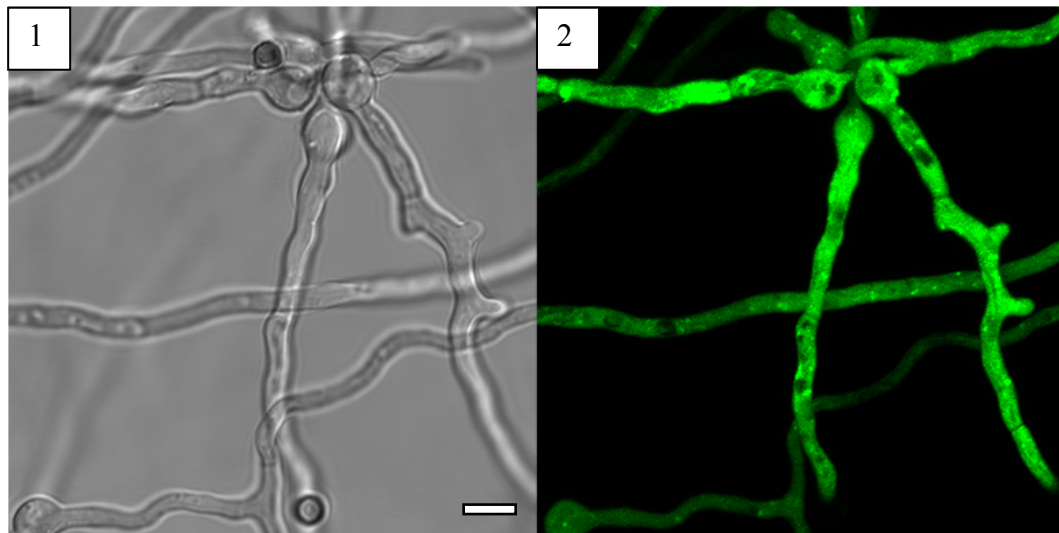
Aufnahme an konfokalem Mikroskop, fixiertes Präparat

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*





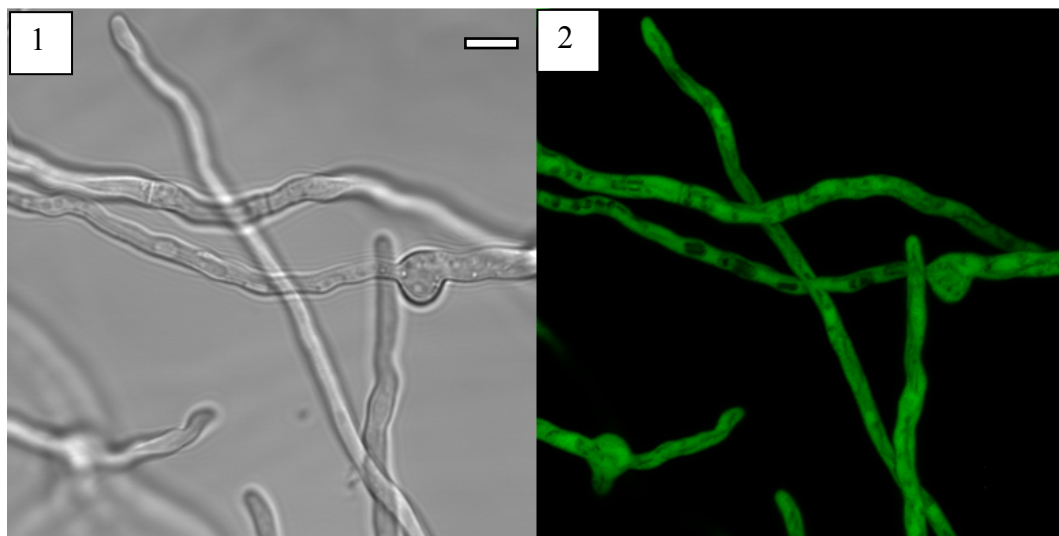
**Abbildung A 12: A26 *gfp-tcsC<sub>1-109</sub>***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*



**Abbildung A 13: A26 *gfp-tcsC<sub>109-208</sub>***

Aufnahme in *Life Cell Imaging*-Kammer an konfokalem Mikroskop

Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

1: *Bright Field (Single Plane)*

2: *GFP (Maximum Intensity Projection)*

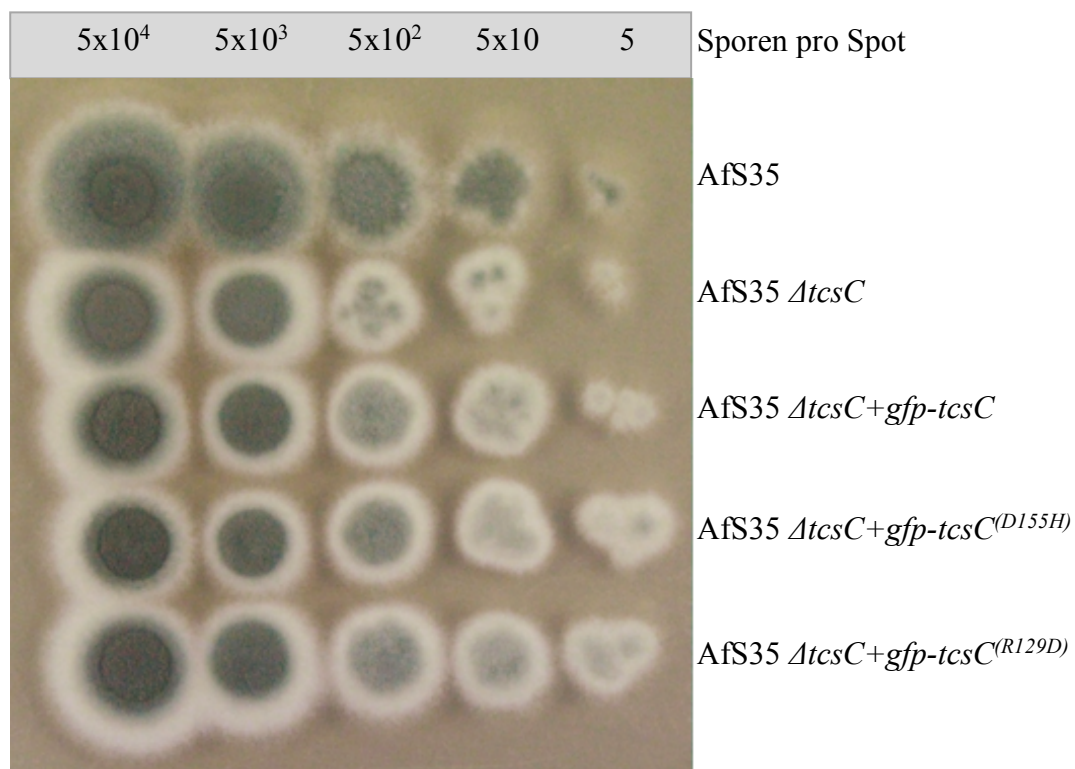


Abbildung A 14: Tüpfeltest auf AMM-Agar

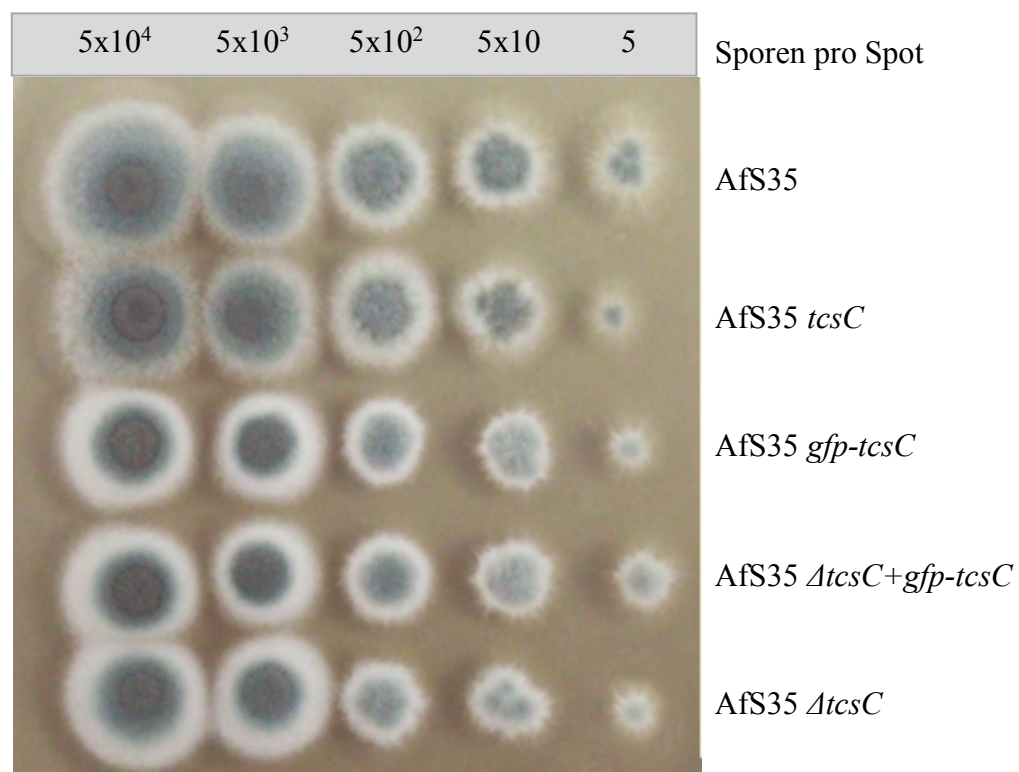


Abbildung A 15: Tüpfeltest auf AMM-Agar

[illegible]

Drk1	PVMGGFEATGKIREYEKKNLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAMDEYLAKPLKQNQMI	1203
TcsC	PVMGGFEATGKIREYEREAGLSRTPIIALTAHAMLGDREKCIQAMDEYLSKPLKQNQMM	1258
	*****: : *****:*****:	
Drk1	QTILKCATLGGSLLEKSKEPRMSSSGEPHPVNSNGMKSIDTKNQRPQMDSQATSASGG	1263
TcsC	QTILKCATLGGSLLEKSKESSLSSGGEIHHHSE-----GKRPGMETRSITASGS	1307
	***** :***** ** .:*****: : :***.	
Drk1	PNPNQKSDVVSTRQTRVAS---SWTKD---	1287
TcsC	IDRGFSSPAAA-KDDEIAMERVSDYRSPKAV	1337
	: . .* .: : :.* .: .	

### Abbildung A 16: Aminosäuresequenz-Alignment der Hybrid-Histidin-Kinasen Drk1 aus *B. dermatitidis* und TcsC aus *A. fumigatus*

Grüne Markierung: Cystein an Position Drk1<sub>392</sub> bzw. TcsC<sub>447</sub>

. ähnliche Aminosäuren  
: sehr ähnliche Aminosäuren  
\* identische Aminosäuren

nidulans	MAIALAEADKYEVLEKIGCGSFGIIRKVKRKS DGFILCRKEINYIKMSTKEREQLTAEFN	60
fumigatus	MAIALAEADKYEVLEKIGCGSFGIIRKVKRKS DGFILCRKEINYIKMSTKEREQLTAEFN	60
	*****	
nidulans	ILSSLRHPNIVAYYHREHLKASQDLYLYMEYCGGGDLSMVIKNLKRNTKYAEEDFVWRIL	120
fumigatus	ILSSLRHPNIVAYYHREHLKASQDLYLYMEYCGGGDLSMVIKNLKRNTKYAEEDFVWRIL	120
	*****	
nidulans	SQLVTALYRCHYGTDPAEVGSNLLGPAPKPSGLKKGQAQMTILHRDLKPENIFLGSDNTV	180
fumigatus	SQLVTALYRCHYGTDPAEVGSNLLGPAPKPSGLKKGQAQMTILHRDLKPENIFLGSDNTV	180
	*****	
nidulans	KLGD FGLSKLMHSHDFASTYVGT PFYMSPEICAAEKYTLRSDI WAGC IMYELCQREPPF	240
fumigatus	KLGD FGLSKLMHSHDFASTYVGT PFYMSPEICAAEKYTLRSDI WAGC IMYELCQREPPF	240
	*****	
nidulans	NARTHIQLVQKIREGKFAPLPDFYSELKNVIASCLRVNPDHRPDATLINTPVIRLMRR	300
fumigatus	NARTHIQLVQKIREGKFAPLPDFYSELKNVIASCLRVNPDHRPDATLINTPVIRLMRR	300
	*****	
nidulans	EVELNNLSRAARKREEATMQAKDVEQAFKLEKEKQIRSELENSIRREWEVKARLEID	360
fumigatus	EVELNNLSRAARKREEATMQAKDVEQAFKLEKEKQIRSELENSIRREWEVKARLEID	360
	*****	
nidulans	RQVQNELDKLRKRFECVQDRVAQEVEKQRRNANYREDASLRSSGHSSQMSSSNSDSD	420
fumigatus	RQVQNELDKLRKRFECVQDRVAQEVEKQRRNANYREDASLRSSGHSSQMSSSNSDSD	420
	*****	
nidulans	PSSTDISQLSLESPTNKA AKLPKKESRTPFTRSKTVVDS PMDIQMAEPSIASLSLSP	480
fumigatus	PSSTDISQLSLESPTNKA AKLPKKESRTPFTRSKTVVDS PMDIQMAEPSIASLSLSP	480
	*****	
nidulans	RRTSATYSGKNIFAEGERKRPKFEPTLAYS DDEDDTPELSPTRPKVKPD PFKAPSRPLL	540
fumigatus	RRTSATYSGKNIFAEGERKRPKFEPTLAYS DDEDDTPELSPTRPKVKPD PFKAPSRPLL	540
	*****	
nidulans	RQNTTALMQKLSTQPPIFPANPSRLPQMSAPDVRESKRSRPHRLSKIPSSANLAADAGS	600
fumigatus	RQNTTALMQKLSTQPPIFPANPSRLPQMSAPDVRESKRSRPHRLSKIPSSANLAADAGS	600
	*****	
nidulans	PTRKNGVKSSPSKMNGGDEMFKAVMQRNMGGRTLVELAQARAGGRPIDEVKRCASDSRSG	660
fumigatus	PTRKNGVKSSPSKMNGGDEMFKAVMQRNMGGRTLVELAQARAGGRPIDEVKRCASDSRSG	660
	*****	
nidulans	CSVPMKSADRDPPAVWDPERDEMPSFFLARGRKVIRNLR*	699
fumigatus	CSVPMKSADRDPPAVWDPERDEMPSFFLARGRKVIRNLR*	699

\*\*\*\*\*

### Abbildung A 17: Aminosäuresequenz-Alignment der homologen NimA-Proteine aus *A. nidulans* und *A. fumigatus*

. ähnliche Aminosäuren  
: sehr ähnliche Aminosäuren  
\* identische Aminosäuren

## **X. DANKSAGUNG**

Mein größter Dank geht an meinen Betreuer und Doktorvater, Prof. Dr. Frank Ebel, der mir, die ich zu Beginn dieser Doktorarbeit keinerlei Erfahrung in der Wissenschaft hatte, die Freude am Forschen näherbrachte. Vielen Dank für deine Geduld, deine vielen Ratschläge und dein Vertrauen!

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Reinhard Straubinger für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl sowie meinen Kollegen Astrid Thomas und Christoph Kleinemeier, die mir in Labor und Büro jederzeit zur Hilfe waren.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. Sven Krappmann, der mir die Türen zu seinem Labor in Erlangen öffnete, als der Erfolg im heimischen Labor zu wünschen übrig lies.

Vielen herzlichen Dank auch an meine lieben Kolleginnen Eli und Isabella, mit denen jeder Arbeitstag gleich viel mehr Spaß machte. Ich werde die Suppen in der Königin und die Kaffeepausen im englischen Garten sehr vermissen!

Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an meine Familie und Freunde, die stets ein offenes Ohr für die kleinen und großen Sorgen eines Doktoranden hatten.